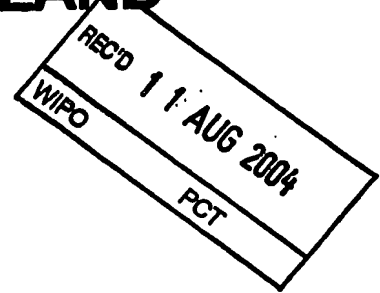


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP04/07255



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 33 479.3

Anmeldetag: 22. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: SunGene GmbH & Co KGaA, 06466 Gatersleben/DE

Bezeichnung: Expressionskassetten zur bidirektionalen transgenen
Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen

IPC: C 12 N 15/82

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Mai 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoß

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Expressionskassetten zur bidirektionalen transgenen Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Expressionskassetten und Vektoren, die pflanzliche bidirektionale Promotoren enthalten, sowie die Verwendung dieser Expressionskassetten oder Vektoren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in pflanzlichen Organismen. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen Expressionskassetten oder Vektoren transformierte transgene pflanzliche Organismen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

10

15

20

25

30

35

Die Herstellung transgener Pflanzen ist eine grundlegende Technik der Pflanzenbiotechnologie und damit eine unerlässliche Voraussetzung für die pflanzliche Grundlagenforschung, sowie für die Herstellung von Pflanzen mit verbesserten, neuen Eigenschaften für die Landwirtschaft, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Eine Grundvoraussetzung für die transgene Expression bestimmter Gene in Pflanzen ist die Bereitstellung pflanzenspezifischer Promotoren. Verschiedene pflanzliche Promotoren sind bekannt. Die derzeit in Pflanzen überwiegend verwendeten konstitutiven Promotoren sind fast ausschließlich virale oder aus *Agrobacterium* isolierte Promotoren wie beispielsweise der CaMV35S Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812). Die zunehmende Komplexität pflanzenbiotechnologischer Arbeiten erfordert oft die Transformation mit mehreren Expressionskonstrukten. Die mehrfache Verwendung ein und desselben Promotors ist insbesondere bei Pflanzen problematisch, da das mehrfache Vorliegen gleicher regulatorischer Sequenzen eine Abschaltung der Genaktivität („Silencing“) bewirken kann (Kumpatla et al. (1998) TIBS 3:97-104; Selker (1999) Cell 97:157-160). Es besteht daher ein zunehmender Bedarf an neuen Promotoren. Ein alternativer Umgang mit diesem Problem ist die Verwendung von sogenannten „bidirektionalen“ Promotoren d.h. regulatorischen Sequenzen, die in beide Richtung eine Transkription der vor- bzw. nachgeschalteten DNA Sequenzen bewirken. Hier können beispielsweise Zielgen und Markergen unter der Kontrolle einer DNA-Sequenz in eine Zelle eingebracht werden.

40

45

Die transgene Expression unter Kontrolle bidirektionaler Promotoren ist bislang kaum beschrieben. Beschrieben ist die Herstellung von bidirektionalen Promotoren aus polaren Promotoren für die Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen mittels Fusion mit weiteren transkriptionellen Elementen (Xie M (2001) Nature Biotech 19: 677-679). Der 35S Promoter wurde ebenfalls in einen bidirektionalen Promoter umgewandelt (Dong JZ et al. (1991) BIO/TECHNOLOGY 9: 858-863). WO 02/64804 beschreibt die Konstruktion eines bidirektionalen Promotor Komplexes basierend auf der Fusion von Enhancer- und Kernpromotorelementen verschiedener viraler (CaMV 35S, CsVMV) und pflanzlicher (Act2, PRb1b) Sequenzen. US20020108142 beschreibt eine regulatorische Sequenz aus einem Intron des Phosphatidylinositol Transfer-like Protein IV aus *Lotus japonicus* (PLP-IV; GenBank Acc.-No.: AF367434) und deren Verwendung als bidirektionaler Promoter. Dieses Intronfragment hat nur in der Infektionszone der Knöllchen eine transkriptionelle Aktivität. Andere Gewebe, Wurzeln, Blätter oder Blüten zeigen keine Färbung.

Pflanzliche Promotoren, die eine bidirektionale, ubiquitäre (d.h. im wesentlichen gewebe-unspezifische) und konstitutive Expression in Pflanzen erlauben, sind bislang nicht offenbart.

5

10

15

20

WO 03/006660 beschreibt einen Promotor eines putativen Ferredoxin Gens sowie Expressionskonstrukte, Vektoren und transgene Pflanzen, die diesen beinhalten. Die isolierten 836 bp 5'-flankierende Sequenz fusioniert mit dem Gen der Glucuronidase zeigen in transgenem Tabak überraschenderweise ein konstitutives Expressionsmuster. Die Sequenz entspricht einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 4 von *Arabidopsis thaliana* wie er in der GenBank unter der Acc.-No. Z97337 hinterlegt ist (Version Z97337.2; Basenpaar 85117 bis 85952; das Gen beginnend ab bp 85953 ist mit "strong similarity to ferredoxin [2Fe-2S] I, *Nostoc muscorum*" annotiert). In den Antheren/Pollen der geschlossenen Blütenknospen konnte nur eine schwache Aktivität, in reifen Blüten gar keine mehr detektiert werden. Entgegen den aus den Literaturbefunden abgeleiteten Vorbehalten gegen eine Eignung des Promotors zur effektiven Expression von Selektionsmarkern (zum Beispiel aufgrund der vermuteten Blattspezifität oder der Funktion im photosynthetischen Elektronentransport), konnte eine hocheffiziente Selektion durch Kombination mit beispielsweise dem Kanamycin-Resistenzgen (*nptII*) demonstriert werden. In WO 03/006660 ist lediglich die Verwendung als „normaler“ konstitutiver Promotor beschrieben. Eine Verwendung als bidirektionaler Promotor ist nicht offenbart.

25

30

Um über einen Transferkomplex möglichst viele Gene in ein Pflanzengenom zu integrieren, ist es notwendig, die Anzahl und Größe regulatorischer Sequenzen für die Expression transgener Nukleinsäuren zu begrenzen. Bidirektional wirkende Promotoren tragen zur Lösung dieser Aufgabe bei. Von besonderem Vorteil ist die Verwendung eines bidirektionalen Promotors, wenn dessen Aktivitäten koordiniert in gleicher Stärke vorhanden sind und auf einem kurzen DNA Fragment liegen. Da die Verwendung viraler Sequenzen für die Expression in transgenen Pflanzen wenig Akzeptanz findet, ist es von Vorteil regulatorische Sequenzen ebenfalls aus Pflanzen zu nutzen.

35

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand in der Bereitstellung von transgenen Expressionskassetten umfassend pflanzliche regulatorische Sequenzen, die eine bidirektionale, ubiquitäre und entwicklungsunabhängige (konstitutive) Expression zweier transgen zu exprimierender Nukleinsäuresequenzen vermitteln.

40

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst. Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionskassetten zur transgenen Expression von zwei Nukleinsäuresequenzen in einer pflanzlichen Zelle umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,

45

b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

c) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens einer pflanzlichen Zelle die Expression von zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

i) Aminosäuresequenzen oder

ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur transgenen Expression von zwei Ribonukleinsäuresequenzen in pflanzlichen Zellen, wobei eine Expressionskassette umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,

b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

c) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

in mindestens eine pflanzliche Zelle eingebracht wird,

wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens besagter pflanzlichen Zelle die Expression besagter zwei unterschiedlichen Ribo-

nukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

- 1) Aminosäuresequenzen oder
- 5 ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

Die in der vorliegenden Erfindung als bidirektionaler Promotor zum Einsatz kommende DNA-Sequenz entspricht der intergenischen Region zwischen einem putativen Ferredoxin (FD) Gen und einem putativen O-Acetyl-Serin-Lyase (OASTL) Gen in *Arabidopsis thaliana*.

Besonders gute Ergebnisse konnten in Pflanzen der Familie der Brassicaceae erzielt werden, wie beispielsweise *Arabidopsis* oder Raps. Aber auch in anderen Pflanzenarten (wie beispielsweise Tabak) konnten sehr gute Ergebnisse (insbesondere bei der Expression von Selektionsmarkern) erzielt werden. Die Expressionsaktivität ist im wesentlichen unabhängig von der Art der nachgeschalteten Nukleinsäure. Die Verwendung des bidirektionalen Promoters ist sowohl für die Expression von Selektionsmarkern als auch für jede andere Nukleinsäure geeignet.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind daher die beiden in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten umfassten transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen bzw. die unter dem erfindungsgemäßen Verfahren exprimierten Ribonukleinsäuresequenzen unterschiedlich. „Unterschiedlich“ heißt in diesem Zusammenhang, dass sich die transgen von beiden Seiten des bidirektionalen Promoters ausgehend exprimierten Ribonukleinsäuresequenzen in mindestens einer Base voneinander unterscheiden. Bevorzugt kodieren beide Nukleinsäuresequenzen für unterschiedliche Proteine, bevorzugt für Proteine mit unterschiedlicher Funktion und/oder Aktivität.

Die Erfindung ermöglicht eine Erhöhung der Zahl von Transkriptionseinheiten bei einer verringerten Zahl von Promotorsequenzen. Im Fall von Translationfusionen können auch mehr als zwei Proteine reguliert werden. Ein besonderer Vorteil dieser Erfindung ist, dass die Expression dieser multiplen Transgene unter der Kontrolle des bidirektionalen Promoters gleichzeitig und synchronisiert stattfindet. Der Promotor ist besonders gut für eine koordinierte Expression von Nukleinsäuren geeignet. So können gleichzeitig

- i) Zielprotein und Selektionsmarker oder Reporterprotein
- 40 ii) Selektionsmarker und Reporterprotein
- ii) Zwei Zielproteine z.B. aus dem gleichen Stoffwechselweg
- iii) Sense und antisense RNA
- iv) Verschiedene Proteine zur Pathogenabwehr

45 und vieles mehr exprimiert werden und verbesserte Effekte in den Pflanzen bewirken.

„Expression“ umfasst die Transkription der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, kann aber - im Falle eines offenen Leserasters in „sense“-Orientierung - auch

die Translation der transkribierten RNA der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz in ein korrespondierendes Polypeptid mit einschließen.

5 „Expressionskassette zur transgenen Expression von Nukleinsäuren oder Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuren umfasst alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommene Konstruktionen oder Verfahren, in denen sich entweder

- 10 a) einer der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 oder eines funktionellen Äquivalentes derselben), oder
- b) die unter der Kontrolle besagten Promotors zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, oder
- 15 c) (a) und (b)

20 sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung (d.h. an ihrem natürlichen chromosomalen Locus) befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren zu exprimierende Nukleinsäuresequenz heterolog in bezug auf besagten Promotor, d.h. die steht natürlicherweise nicht unter dessen Kontrolle, sondern besagte Kontrolle würde (beispielsweise durch gentechnische Verfahren) in nicht-natürlicher

25 Weise hergestellt.

30 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten, von ihnen abgeleitete Vektoren oder die erfindungsgemäßen Verfahren können funktionelle Äquivalente zu den unter SEQ ID NO: 1 oder 2 beschriebenen Promotorsequenzen umfassen. Funktionell äquivalente Sequenzen umfassen auch all die Sequenzen, die von dem komplementären Gegenstrang der durch SEQ ID NO: 1 oder 2 definierten Sequenzen abgeleitet sind und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität aufweisen. Funktionelle Äquivalente in bezug auf die erfindungsgemäßen Promotoren meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der unter SEQ ID NO: 1 oder 2 beschriebenen Promotorsequenzen sowie deren Homologe aus anderen Pflanzengattungen und -

35 arten, welche weiterhin im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität aufweisen.

40 Eine Promotoraktivität wird im wesentlichen als gleich bezeichnet, wenn die Transkription eines bestimmten zu exprimierenden Gens unter Kontrolle eines bestimmten von SEQ ID NO: 1 oder 2 abgeleiteten Promotors unter ansonsten unveränderten Bedingungen eine Lokalisation innerhalb der Pflanze aufweist, die zu mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90% ganz besonders bevorzugt mindestens 95% deckungsgleich ist mit einer Vergleichsexpression erhalten unter Verwendung eines des durch SEQ ID NO: 1 oder 2 beschriebenen Promotors.

45 Dabei kann die Expressionshöhe sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Vergleichswert abweichen. Bevorzugt sind dabei solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um nicht mehr als 50%, bevorzugt 25%, besonders bevorzugt 10 % sich von einem

Vergleichswert erhalten mit einem durch SEQ ID NO: 1 oder 2 beschriebenen Promotor unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um mehr als 50%,
5 bevorzugt 100%, besonders bevorzugt 500%, ganz besonders bevorzugt 1000% eines Vergleichswert erhalten mit dem durch SEQ ID NO:1 beschriebenen Promotor übersteigt. Bevorzugt ist als Vergleichswert die Expressionshöhe der natürlichen mRNA des jeweiligen Gens oder des natürlichen Genproduktes. Bevorzugt ist ferner als Vergleichswert die Expressionshöhe erhalten mit einer beliebigen, aber bestimmten
10 Nukleinsäuresequenz, bevorzugt solchen Nukleinsäuresequenzen, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E & Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44) wie das "Green Fluorescence Protein" (GFP) (Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicoltransferase, eine
15 Luziferase (Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414) oder die β -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J. 6:3901-3907).

Ansonsten unveränderte Bedingungen bedeutet, dass die Expression, die durch eine
20 der zu vergleichenden Expressionskassetten initiiert wird, nicht durch Kombination mit zusätzlichen genetischen Kontrollsequenzen, zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, modifiziert wird. Unveränderte Bedingungen bedeutet ferner, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Pflanzenart, Entwicklungsstadium der Pflanzen, Zuchtbedingungen, Testbedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate etc.) zwischen den
25 zu vergleichenden Expressionen identisch gehalten werden.

Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversionen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch
30 solche Nukleinsäuresequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation eines Promotors gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzymststellen, die Entfernung überflüssiger DNA oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen, zum Beispiel weiterer regulatorischer Sequenzen, sein.

35 Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie z.B. Transitionen und Transversionen, in Frage kommen, können an sich bekannte Techniken, wie in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Durch Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen
40 für "blunt ends" können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden. Zu analogen Ergebnissen kann man auch unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer kommen.

45 Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung

folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 12

Length Weight: 4

5 Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

10 Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 50 % aufweist.

15 Funktionelle Äquivalente zu dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 umfasst bevorzugt solche Sequenzen, die eine Identität aufweisen von mindestens 80 %, bevorzugt 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 und weiterhin im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 aufweisen.

20 Funktionelle Äquivalente zu dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst bevorzugt solche Sequenzen, die eine Identität aufweisen von mindestens 80 %, bevorzugt 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 und weiterhin im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweisen.

25 Weitere Beispiele für die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren zum Einsatz kommenden Promotorsequenzen lassen sich beispielsweise in verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie beispielsweise aus *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Helianthium annuus*, *Linum sativum* durch Identitätsvergleiche in Datenbanken leicht auffinden.

35 Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer funktioneller Äquivalente umfasst bevorzugt die Einführung von Mutationen in einen Promotor gemäß SEQ ID NO: 1. Eine Mutagenese kann ungerichtet ("random") erfolgen, wobei die mutagenisierten Sequenzen anschließend bezüglich ihrer Eigenschaften nach einer "trial-by-error" Prozedur durchmustert werden. Besonders vorteilhafte Selektionskriterien umfassen beispielsweise eine erhöht Resistenz gegenüber einem Selektionsmarker, die Höhe der resultierenden Expression der eingeführten Nukleinsäuresequenz.

40 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können essentielle regulatorische Elemente der erfindungsgemäßen Promotoren gezielt isoliert und als solche oder in Kombination mit anderen regulatorischen Elementen eingesetzt werden. Folglich umfasst ein Gegenstand der Erfindung funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 welche mindestens 25, bevorzugt mindestens 50, besonders bevorzugt mindestens 100, ganz besonders bevorzugt mindestens 200, am meisten bevorzugt mindestens 400 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen

gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen.

Alternativ können nicht-essentielle Sequenzen eines der erfindungsgemäßen Promotors deletiert werden ohne die genannten Eigenschaften signifikant zu beeinträchtigen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst daher funktionell äquivalente Fragmente einer der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen, die mindestens 25, bevorzugt mindestens 50, besonders bevorzugt mindestens 100, ganz besonders bevorzugt mindestens 200, am meisten bevorzugt mindestens 400 aufeinanderfolgende Nukleotide einer der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen.

Die Eingrenzung der Promotorsequenz auf bestimmte, essentielle regulatorische Regionen kann auch mit Hilfe von Suchroutine zur Suche von Promotorelementen vorgenommen werden. Oft sind in den für die Promotoraktivität relevanten Regionen bestimmte Promotorelemente gehäuft vorhanden. Diese Analyse kann beispielsweise mit Computerprogrammen wie dem Programm PLACE ("Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements") vorgenommen werden (Higo K et al. (1999) Nucleic Acids Res 27:1, 297-300) oder der BIOBASE Datenbank "Transfac" (Biologische Datenbanken GmbH, Braunschweig).

Verfahren zur Mutagenisierung von Nukleinsäuresequenzen sind dem Fachmann bekannt und schließen beispielhaft die Verwendung von Oligonukleotiden mit einer oder mehr Mutationen im Vergleich zu der zu mutierenden Region ein (z.B. im Rahmen einer "Site-specific mutagenesis"). Typischerweise kommen Primer mit ungefähr 15 bis ungefähr 75 Nukleotiden oder mehr zum Einsatz, wobei bevorzugt ca. 10 bis ca. 25 oder mehr Nukleotidreste an beiden Seiten der zu verändernden Sequenz lokalisiert sind. Details und Durchführung besagter Mutageneseverfahren sind dem Fachmann geläufig (Kunkel et al. (1987) Methods Enzymol 154:367-382; Tomic et al. (1990) Nucl Acids Res 12:1656; Upender et al. (1995) Biotechniques 18(1):29-30; US 4,237,224). Eine Mutagenese kann auch durch Behandlung von beispielsweise Vektoren, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten, mit mutagenisierenden Agentien wie Hydroxylamin realisiert werden.

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthaltenen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem der erfindungsgemäßen Promotoren funktionell verknüpft sein.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors, der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz

5 hinter der als Promotor fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

10 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY sowie in Silhavy TJ et al. (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY und in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch
15 weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen.

20 Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen der erfindungsgemäßen Promotoren und 3'-strom-
25 abwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

30 Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionsteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) und Hitzestress (Schöffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.
35

40 Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengewebe oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage. Vorstellbar ist zum Beispiel, dass eine bestimmte Nukleinsäuresequenz durch einen Promotor (zum Beispiel einen der erfindungsgemäßen Promotoren) in einem Pflanzengewebe als sense-RNA transkribiert und in das entsprechende Protein translatiert wird, während die gleiche Nukleinsäuresequenz durch einen anderen
45 Promotor mit einer anderen Spezifität in einem anderen Gewebe zu anti-sense-RNA transkribiert und das entsprechende Protein herunterreguliert wird. Dieses kann durch eine erfindungsgemäße Expressionskassette realisiert werden, indem der eine Promotor vor die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz positioniert wird und der andere Promotor dahinter.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen, bevorzugt des pFD Genes und/oder des OASTL Genes. Es ist gezeigt worden, dass untranslatierte Regionen eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al.(1998) Plant J. 15:435-440.). Umgekehrt unterdrückt die 5'-untranslatierte Region des opaque-2 Gens die Expression. Eine Deletion der entsprechenden Region führt zu einer Erhöhung der Genaktivität (Lohmer S et al. (1993) Plant Cell 5:65-73). Die unter SEQ ID NO: 2 angegebene Nukleinsäuresequenz enthält den Abschnitt des FD-Gens und des OASTL Gens, der den Promotor und die 5'-untranslatierte Region bis vor das ATG-Startcodon des jeweiligen Proteins repräsentiert. In der 5' untranslatierten Region des OASTL Gens befindet sich ein Intron, was durch die Struktur der cDNA Klon belegt werden kann. Die Intron Grenzen liegen bei 14 bp (3' Seite des Introns) und 281 bp (5' Seite des Introns). Basenpaar Nummerierung entsprechend der Nummerierung des Promotors gemäß SEQ ID NO: 2. Das Intron hat eine starke expressionsfördernde Funktion in beide Transkriptionsrichtungen. Dies könnte durch die Existenz eines Enhancers in dieser Region begründet sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist daher der erfindungsgemäße bidirektionale Promotor beschrieben durch die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder durch Sequenzen die eine Identität von mindestens 80%, bevorzugt mindestens 90%, besonders bevorzugt mindestens 95%, ganz besonders bevorzugt mindestens 98%, am meisten bevorzugt mindestens 99% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 haben.

Weitere 5'-untranslatierte Sequenzen sowie Introns mit expressionsfördernder Funktion sind dem Fachmann bekannt. McElroy und Mitarbeiter (McElroy et al. (1991) Mol Gen Genet 231(1):150-160) berichteten von einem auf dem Reis Actin 1 (Act1) Promotor basierenden Konstrukt zur Transformation monokotyle Pflanzen. In transgenen Reiszellen führte die Verwendung des Act1-Introns in Kombination mit dem 35S-Promotor zu einer gegenüber dem isolierten 35S-Promotor um das Zehnfache gesteigerten Expressionsrate. Eine Optimierung der Sequenzumgebung der Translations-Initiationsstelle des Reportergen-Gens (GUS) resultierte in einer vierfachen Steigerung der GUS-Expression in transformierten Reiszellen. Eine Kombination der optimierten Translations-Initiationsstelle und des Act1-Introns resultierte in einer 40-fachen Steigerung der GUS-Expression durch den CaMV35S-Promotor in transformierten Reiszellen; ähnliche Ergebnisse wurden anhand von transformierten Maiszellen erzielt. Insgesamt wurde aus den zuvor beschriebenen Untersuchungen geschlossen, dass die auf dem Act1-Promotor basierenden Expressionsvektoren dazu geeignet sind, eine hinreichend starke und konstitutive Expression von Fremd-DNA in transformierten Zellen monokotyle Pflanzen zu steuern.

Die Expressionskassette kann eine oder mehrere sogenannte "Enhancer"-Sequenzen funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgenen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen

zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien in einer der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten sein.

5 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promotor eines bestimmten Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der
10 Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B. (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

15 Der einzuführende Promotor kann mittels homologer Rekombination vor das transgen zu exprimierende Zielgen platziert werden, indem der Promotor mit DNA-Sequenzen verknüpft wird, die zum Beispiel zu endogenen Sequenzen homolog sind, die dem Leseraster des Zielgens vorgelagert sind. Derartige Sequenzen sind als genetische Kontrollsequenzen zu verstehen. Nachdem eine Zelle mit dem entsprechenden DNA-Konstrukt transformiert wurde, können die beiden homologen Sequenzen interagieren und so die Promotorsequenz an dem gewünschten Ort vor dem Zielgen platzieren, so
20 dass die Promotorsequenz nun in funktioneller Verknüpfung mit dem Zielgen steht und eine erfindungsgemäße Expressionskassette bildet. Die Auswahl der homologen Sequenzen bestimmt den Insertionsort des Promotors. Hierbei kann die Expressionskassette durch homologe Rekombination mittels einer einfachen oder einer doppelten-reziproken Rekombination generiert werden. Bei der einfach reziproken Rekombination wird nur eine einzelne Rekombinationssequenz verwendet und es erfolgt die Insertion der gesamten eingeführten DNA. Bei der doppelt-reziproken Rekombination ist die einzuführende DNA durch zwei homologe Sequenzen flankiert und es erfolgt die Insertion des flankierten Bereiches. Letzteres Verfahren ist geeignet, um wie oben
25 beschrieben den natürlichen Promotor eines bestimmten Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren auszutauschen und so den Expressionsort und -zeitpunkt dieses Gens zu modifizieren. Diese funktionelle Verknüpfung stellt eine erfindungsgemäße Expressionskassette dar.

30 Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen. Verschiedene geeignete Marker sind unten genannt. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten. Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige
35 Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben.

40 Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, sowie - vorzugsweise - solche aus *Agrobacterium tumefaciens*. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die Expressionskassette eine in Pflanzen funktionelle Terminatorsequenz. In Pflanzen funktionelle Terminatorsequenzen meint allgemein solche Sequenzen, die in der Lage sind, in Pflanzen den

12

Abbruch der Transkription einer DNA-Sequenz zu bewirken. Beispiele für geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinn-Synthase)-Terminator. Besonders bevorzugt sind jedoch pflanzliche Terminatorsequenzen. Pflanzliche Terminatorsequenzen meint allgemein solche Sequenzen, die Bestandteil eines natürlichen pflanzlichen Gens sind. Besonders bevorzugt sind dabei der Terminator des Cathepsin D Inhibitor Gens aus Kartoffel (GenBank Acc. No.: X74985) oder des Terminators der Speicherproteingens VfLEIB3 (GenBank Acc. No.: Z26489) aus der Ackerbohne. Diese Terminatoren sind den im Stand der Technik beschriebenen viralen oder T-DNA Terminatoren mindestens gleichwertig.

Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Nukleinsäuren bzw. Proteinen bekannt, deren rekombinante Expression gesteuert durch die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Verfahren vorteilhaft ist. Ferner sind dem Fachmann eine Vielzahl von Genen bekannt, durch deren Reprimierung oder Ausschaltung mittels Expression einer entsprechenden antisense-RNA ebenfalls vorteilhafte Effekte erreicht werden können. Beispielshaft jedoch nicht einschränkend für vorteilhafte Effekte seien zu nennen:

- Erleichterte Herstellung eines transgenen Organismus beispielsweise durch die Expression von Selektionsmarkern
- Erzielen einer Resistenz gegen abiotische Stressfaktoren (Hitze, Kälte, Trockenheit, erhöhte Feuchtigkeit, Umweltgifte, UV-Strahlung)
- Erzielen einer Resistenz gegen biotische Stressfaktoren (Pathogene, Viren, Insekten und Krankheiten)
- Verbesserung von Nahrungs- oder Futtereigenschaften
- Verbesserung der Wachstumsrate oder des Ertrages.

Nachfolgend seien einige konkrete Beispiele für Nukleinsäuren genannt, deren Expression die gewünschten vorteilhaften Effekte bietet:

1. Selektionsmarker

Selektionsmarker umfasst sowohl positive Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen ein Antibiotikum, Herbizid oder Biozid verleihen, als auch negative Selektionsmarker, die eine Sensitivität gegen eben diese verleihen, als auch Marker die dem transformierten Organismus einen Wachstumsvorteil gewähren (beispielsweise durch Expression von Schlüsselgenen der Cytokinbiosynthese; Ebinuma H et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121). Bei der positiven Selektion gedeihen nur die Organismen, die den entsprechenden Selektionsmarker exprimieren, während bei der negativen Selektion eben diese eingehen. Bei der Herstellung transgener Pflanzen ist die Verwendung eines positiven Selektionsmarkers bevorzugt. Bevorzugt ist ferner die Verwendung von Selektionsmarkern, die Wachstumsvorteile verleihen. Negative Selektionsmarker können vorteilhaft verwendet werden, wenn es darum geht, bestimmte Gene oder Genomabschnitte aus einem Organismus zu entfernen (beispielsweise im Rahmen eines Kreuzungsprozesses).

Der mit der Expressionskassette eingebrachte selektionierbare Marker verleiht den erfolgreich rekombinierten oder transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid wie Phosphinothricin, Glyphosat oder Bromoxynil), einen Metabolismushemmer wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Rep 5:81-84). Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Dem Fachmann sind zahlreiche derartiger Selektionsmarker und die für diese kodierenden Sequenzen bekannt. Nachfolgend seien beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu nennen:

i) Positive Selektionsmarker:

Der mit der Expressionskassette eingebrachte selektionierbare Marker verleiht der erfolgreich transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid wie Phosphinothricin, Glyphosat oder Bromoxynil), einen Metabolismushemmer wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum, wie zum Beispiel Tetracyclin, Ampicillin, Kanamycin, G 418, Neomycin, Bleomycin oder Hygromycin. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft als Selektionsmarker seien genannt:

- DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT; auch Bialaphos-Resistenzgen (bar) genannt) kodieren und eine Detoxifizierung des Herbizids Phosphinothricin (PPT) bewirken (de Block et al. (1987) EMBO J 6:2513-2518). Geeignete bar Gene können aus beispielsweise *Streptomyces hygroscopicus* oder *S. viridochromogenes* isoliert werden. Entsprechende Sequenzen sind dem Fachmann bekannt (GenBank Acc.-No.: X17220, X05822, M22827, X65195; US 5,489,520). Ferner sind synthetische Gene beispielsweise für die Expression in Plastiden beschrieben AJ028212. Ein synthetisches Pat Gen ist beschrieben bei Becker et al. (1994) Plant J 5:299-307. Die Gene verleihen Resistenz gegen das Herbizid Bialaphos und sind ein vielbenutzter Marker in transgenen Pflanzen (Vickers JE et al. (1996) Plant Mol Biol Rep 14:363-368; Thompson CJ et al. (1987) EMBO J 6:2519-2523).
- 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-synthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen (Steinrücken HC et al. (1980) Biochem Biophys Res Commun 94:1207-1212; Levin JG und Sprinson DB (1964) J Biol Chem 239:1142-1150; Cole DJ (1985) Mode of action of glyphosate; A literature analysis, p. 48-74. In: Grossbard E und Atkinson D (eds.). The herbicide glyphosate. Butterworths, Boston.). Glyphosat-tolerante EPSPS Varianten werden bevorzugt als Selektionsmarker verwendet (Padgett SR et al. (1996). New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. In: Herbicide Resistant Crops (Duke SO ed.), pp. 53-84. CRC Press, Boca Raton, FL; Saroha MK und Malik VS (1998) J Plant Biochem Biotechnol 7:65-72). Das EPSPS Gen des *Agrobacterium* sp. strain CP4 hat eine natürliche Toleranz gegen Glyphosat, die auf entsprechende transgene Pflanzen transferiert werden kann (Padgett SR et al. (1995) Crop Science 35(5):1451-1461). 5-Enol-

14

pyrpylshikimate-3-phosphate-synthasen, die Glyphosat-tolerant sind, sind beispielsweise beschrieben in US 5,510,471; US 5,776,760; US 5,864,425; US 5,633,435; US 5,627,061; US 5,463,175; EP 0 218 571. Weitere Sequenzen sind beschrieben unter GenBank Accession X63374. Ferner ist das *aroA* Gen bevorzugt (M10947).

- 5 - das für das Glyphosat degradierende Enzyme kodierende *gox* Gen (Glyphosat-oxido-reduktase aus *Achromobacter* sp.). GOX kann eine Resistenz gegen Glyphosat vermitteln (Padgett SR et al. (1996) J Nutr.126(3):702-16; Shah D et al. (1986) Science 233: 478-481).
- 10 - das *deh* Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), (GenBank Acc.-No.: AX022822, AX022820 sowie WO99/27116)
- 15 - *bxn* Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren. Beispielsweise die Nitrilase aus *Klebsiella ozananae*. Sequenzen sind in der GenBank beispielsweise unter den Acc.-No: E01313 und J03196 zu finden.
- 20 - Neomycinphosphotransferasen verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika (Aminoglykoside) wie Neomycin, G418, Hygromycin, Paromomycin oder Kanamycin, indem sie durch eine Phosphorylierungsreaktion deren inhibierende Wirkung reduzieren. Besonders bevorzugt ist das *nptII* Gen. Sequenzen können aus der GenBank erhalten werden (AF080390 Minitransposon mTn5-GNm; AF080389 Minitransposon mTn5-Nm, complete sequence). Zudem ist das Gen bereits Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden (AF234316 pCAMBIA-2301; AF234315 pCAMBIA-2300, AF234314 pCAMBIA-2201). Das NPTII Gen kodiert für eine Aminoglycosid-3'-O-phosphotransferase aus *E.coli*, Tn5 (GenBank Acc.-No: U00004 Position 1401-2300; Beck et al. (1982) Gene 19 327-336).
- 25 - das *DOG^{R1}*-Gen. Das Gen *DOG^{R1}* wurde aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (EP 0 807 836). Es codiert für eine 2-Desoxyglukose-6-phosphat Phosphatase, die Resistenz gegenüber 2-DOG verleiht (Randez-Gil et al. 1995, Yeast 11, 1233-1240; Sáenz et al. (1994) Yeast 10:1195- 1202, Sequenz: GenBank Acc.-No.: NC001.140 chromosom VIII, *Saccharomyces cerevisiae* Position 194799-194056).
- 30 - Sulfonharnstoff- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen, die eine Resistenz gegen Imidazolinon/Sulfonharnstoff-Herbizide verleihen. Geeignet sind beispielsweise die unter der GenBank Acc.-No.: X51514 hinterabgelegte Sequenz für das *Arabidopsis thaliana* *Csr 1.2* Gen (EC 4.1.3.18) (Sathasivan K et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18(8):2188). Acetolactatsynthasen die eine Resistenz gegen Imidazolinon-Herbizide verleihen sind ferner beschrieben unter den GenBank Acc.-No.: AB049823, AF094326, X07645, X07644, A19547, A19546, A19545, I05376, I05373, AL133315.
- 35 - Hygromycinphosphotransferasen (X74325 *P. pseudomallei* gene for hygromycin phosphotransferase) die eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin verleihen. Das Gen ist Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter
- 40
- 45

Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden (AF294981 pINDEX4; AF234301 pCAMBIA-1380; AF234300 pCAMBIA-1304; AF234299 pCAMBIA-1303; AF234298 pCAMBIA-1302; AF354046 pCAMBIA-1305.; AF354045 pCAMBIA-1305.1)

5

- Resistenzgene gegen

a) Chloramphenicol (Chloramphenicolacetyltransferase),

10

b) Tetracyclin, verschiedene Resistenzgene sind beschrieben z.B. X65876 S. ordonez genes class D tetA and tetR for tetracycline resistance and repressor proteins X51366 Bacillus cereus plasmid pBC16 tetracycline resistance gene. Zudem ist das Gen bereits Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden

15

c) Streptomycin, verschiedene Resistenzgene sind beschrieben z.B. mit der Gen-Bank Acc.-No.:AJ278607 Corynebacterium acetoacidophilum ant gene for streptomycin adenylyltransferase.

20

d) Zeocin, das entsprechende Resistenzgen ist Bestandteil zahlreicher Klonierungsvektoren (z.B. L36849 Cloning vector pZEO) und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden.

25

e) Ampicillin (β -Lactamase Gen; Datta N, Richmond MH.(1966) Biochem J. 98(1):204-9; Heffron F et al (1975) J. Bacteriol 122: 250-256; das Amp Gen wurde zuerst zur Herstellung des E. coli Vektors pBR322 kloniert; Bolivar F et al. (1977) Gene 2:95-114). Die Sequenz ist Bestandteil zahlreicher Klonierungsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden.

30

- Gene wie die Isopentenyltransferase aus Agrobacterium tumefaciens (strain:PO22) (Genbank Acc.-No.: AB025109). Das ipt Gen ist ein Schlüsselenzym der Cytokin-Biosynthese. Seine Überexpression erleichtert die Regeneration von Pflanzen (z.B. Selektion auf Cytokin-freiem Medium). Das Verfahren zur Nutzung des ipt Gens ist beschrieben (Ebinuma H et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121; Ebinuma H et al. (2000) Selection of Marker-free transgenic plants using the oncogenes (*ipt*, *rol* A, B, C) of Agrobacterium as selectable markers, In Molecular Biology of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers).

35

40

45

Verschiedene weitere positive Selektionsmarker, die den transformierten Pflanzen einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht-transformierten verleihen, sowie Verfahren zu ihrer Verwendung sind u.a. beschrieben in EP-A 0 601 092. Beispielhaft sind zu nennen β -Glucuronidase (in Verbindung mit z.B. Cytokininglucuronid), Mannose-6-phosphat-Isomerase (in Verbindung mit Mannose), UDP-Galaktose-4-Epimerase (in Verbindung mit z.B. Galactose), wobei Mannose-6-phosphat-Isomerase in Verbindung mit Mannose besonders bevorzugt ist.

II) Negative Selektionsmarker

Negative Selektionsmarker ermöglichen beispielsweise die Selektion von Organismen mit erfolgreich deletierten Sequenzen, die das Markergen umfassen (Koprek T et al. (1999) Plant J 19(6):719-726). Bei der negativen Selektion wird beispielsweise durch den in die Pflanze eingebrachten negativen Selektionsmarker eine Verbindung, die ansonsten für die Pflanze keine nachteilige Wirkung hat, in eine Verbindung mit nachteiliger Wirkung umgesetzt. Ferner sind Gene geeignet, die per se eine nachteilige Wirkung haben, wie zum Beispiel Thymidinkinase (TK), Diphtheria Toxin A Fragment (DT-A), das codA Genprodukt kodierend für eine Cytosindeaminase (Gleave AP et al. (1999) Plant Mol Biol. 40(2):223-35; Perera RJ et al. (1993) Plant Mol. Biol 23(4): 793-799; Stougaard J (1993) Plant J 3:755-761), das Cytochrom P450 Gen (Koprek et al. (1999) Plant J 16:719-726), Gene kodierend für eine Haloalkan Dehalogenase (Naested H (1999) Plant J 18:571-576), das *laaH* Gen (Sundaresan V et al. (1995) Genes & Development 9:1797-1810) oder das *tms2* Gen (Fedoroff NV & Smith DL (1993) Plant J 3:273-289).

Die jeweils für die Selektion verwendeten Konzentrationen der Antibiotika, Herbizide, Biozide oder Toxine müssen an die jeweiligen Testbedingungen bzw. Organismen angepasst werden. Beispielhaft seien für Pflanzen zu nennen Kanamycin (Km) 50 mg/l, Hygromycin B 40 mg/l, Phosphinothricin (Ppt) 6 mg/l.

Ferner können funktionelle Analoga der genannten Nukleinsäuren kodierend für Selektionsmarker exprimiert werden. Funktionelle Analoga meint hier all die Sequenzen, die im wesentlichen die gleiche Funktion haben d.h. zu einer Selektion transformierter Organismen befähigt sind. Dabei kann das funktionelle Analogon sich in anderen Merkmalen durchaus unterscheiden. Es kann zum Beispiel eine höhere oder niedrigere Aktivität haben oder auch über weitere Funktionalitäten verfügen.

2. Verbesserter Schutz der Pflanze gegen abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Hitze, oder Kälte zum Beispiel durch Überexpression von "antifreeze"- Polypeptiden aus *Myoxocephalus Scorpius* (WO 00/00512), *Myoxocephalus octodecemspinosus*, dem *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsaktivator CBF1, Glutamatdehydrogenasen (WO 97/12983, WO 98/11240), Calcium-abhängigen Proteinkinasegenen (WO 98/26045), Calcineurinen (WO 99/05902), Farnesyltransferasen (WO 99/06580), Pei ZM et al., Science 1998, 282: 287-290), Ferritin (Deak M et al., Nature Biotechnology 1999, 17:192-196), Oxalatoxidase (WO 99/04013; Dunwell JM Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 1998, 15:1-32), DREB1A-Faktor (dehydration response element B 1A; Kasuga M et al., Nature Biotechnology 1999, 17:276-286), Genen der Mannitol- oder Trehalosesynthese wie der Trehalosephosphatsynthase oder der Trehalosephosphatphosphatase (WO 97/42326), oder durch Inhibition von Genen wie der Trehalase (WO 97/50561). Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den transkriptionellen Aktivator CBF1 aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: U77378) oder das "antifreeze protein" aus *Myoxocephalus octodecemspinosus* (GenBank Acc.-No.: AF306348) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

3. Expression von Stoffwechsellzymen zur Verwendung im Futter- und Nahrungsmittelbereich, zum Beispiel die Expression von Phytase und Cellulasen. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren wie die künstliche für eine mikrobielle Phytase kodierende cDNA (GenBank Acc.-No.: A19451) oder funktionelle Äquivalente derselben.
4. Erreichen einer Resistenz zum Beispiel gegen Pilze, Insekten, Nematoden und Krankheiten durch gezielte Absonderung oder Anreicherung bestimmter Metaboliten oder Proteine in der Epidermis des Embryos. Beispielhaft seien genannt Glucosinolate (Abwehr von Herbivoren), Chitinasen oder Glucanasen und andere Enzyme die die Zellwand von Parasiten zerstören, Ribosom-inaktivierende Proteine (RIPs) und andere Proteine der pflanzlichen Resistenz- und Stressreaktion, wie sie bei Verletzung oder mikrobiellem Befall von Pflanzen oder chemisch durch zum Beispiel Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen induziert werden, Lysozyme aus nicht-pflanzlichen Quellen wie zum Beispiel T4 Lysozym oder Lysozym aus verschiedenen Säugern, insektizide Proteine wie *Bacillus thuringiensis* Endotoxin, α -Amylaseinhibitor oder Proteaseinhibitoren (cowpea Trypsininhibitor), Glucanasen, Lectinen wie Phytohemagglutinin, Weizenkeimagglutinin, RNAsen oder Ribozyme. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die chit42 Endochitinase aus *Trichoderma harzianum* (GenBank Acc.-No.: S78423) oder für das N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450 (CYP79) Proteine aus *Sorghum bicolor* (GenBank Acc.-No.: U32624) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
5. Bekannt ist die Akkumulation von Glucosinolaten in Pflanzen der Gattung der Cardales insbesondere der Ölsaaten zum Schutz vor Schädlingen (Rask L et al.(2000) Plant Mol Biol 42:93-113; Menard R et al. (1999) Phytochemistry 52:29-35), die Expression des *Bacillus thuringiensis* Endotoxin unter Kontrolle des 35 S CaMV Promotors (Vaech et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promotors (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-119.
- Die Expression synthetischer cryIA(b) and cryIA(c) Gene, die für Lepidopteren-spezifische delta-Endotoxine aus *Bacillus thuringiensis* kodieren, kann in verschiedenen Pflanzen eine Resistenz gegen Schadinsekten bewirken. So kann in Reis eine Resistenz gegen zwei der wichtigsten Reisschädlinge, den gestreiften Stengelbohrer (*Chilo suppressalis*) und den gelben Stengelbohrer (*Scirpophaga incertulas*), erzielt werden (Cheng X et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(6):2767-2772; Nayak P et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2111-2116).
5. Expression von Genen, die eine Akkumulation von Feinchemikalien, wie von Tocopherolen, Tocotrienolen oder Carotinoiden bewirken. Beispielhaft sei die Phytoendesaturase genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Phytoendesaturase aus *Narcissus pseudonarcissus* (GenBank Acc.-No.: X78815) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

- 5 6. Produktion von Nutraceuticals wie zum Beispiel polyungesättigten Fettsäuren wie beispielsweise Arachidonsäure oder EP (Eicosapentaensäure) oder DHA (Docosahexaensäure) durch Expression von Fettsäureelongasen und/oder -desaturasen oder Produktion von Proteinen mit verbessertem Nahrungswert wie zum Beispiel mit einem hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren (z.B. das methioninreiche 2S Albumin der Brasilnuss). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für das methioninreiche 2S Albumin aus *Bertholletia excelsa* (GenBank Acc.-No.: AB044391), die $\Delta 6$ -Acylipiddesaturase aus *Physcomitrella patens* (GenBank Acc.-No.: AJ222980; Girke et al. (1998) Plant J 15:39-48), die $\Delta 6$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Sakuradani et al. (1999) Gene 238:445-453), die $\Delta 5$ -Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Michaelson et al. 1998, FEBS Letters 439:215-218), die $\Delta 5$ -Fettsäuredesaturase (des-5) aus *Caenorhabditis elegans* (GenBank Acc.-No.: AF078796), die $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Michaelson et al. J Biol Chem 273:19055-19059), die $\Delta 6$ -Elongase aus *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin et al. (2000) Proc Natl. Acad Sci USA 97:6421-6426), die $\Delta 6$ -Elongase aus *Physcomitrella patens* (Zank et al. (2000) Biochemical Society Transactions 28:654-657) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 20 7. Produktion von Feinchemikalien (wie beispielsweise Enzymen) und Pharmazeutika (wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakzinen wie beschrieben bei Hood EE, Jilka JM. (1999) Curr Opin Biotechnol. 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92). Beispielsweise konnte rekombinantes Avidin aus Hühnereiweiß und bakterieller β -Glucuronidase (GUS) in großen Maßstab in transgenen Maispflanzen produziert werden (Hood et al. (1999) Adv Exp Med Biol 464:127-47). Diese rekombinanten Proteine aus Maispflanzen werden von der Firma Sigma Chemicals Co. als hochreine Biochemikalien vertrieben.
- 30 8. Erreichen einer erhöhten Speicherkapazität in Zellen, die normalerweise weniger Speicherproteine oder -lipide enthalten mit dem Ziel, den Ertrag an diesen Substanzen zu erhöhen, zum Beispiel durch Expression einer Acetyl-CoA Carboxylase. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Acetyl-CoA Carboxylase (Accase) aus *Medicago sativa* (GenBank Acc.-No.: L25042) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 35
- Weitere Beispiele für vorteilhafte Gene sind zum Beispiel genannt bei Dunwell JM (2000) J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.
- 40 Ferner können funktionelle Analoga der genannten Nukleinsäuren bzw. Proteine exprimiert werden. Funktionelle Analoga meint hier all die Sequenzen, die im wesentlichen die gleiche Funktion haben d.h. zu der Funktion (zum Beispiel einer Substratumsetzung oder einer Signaltransduktion) befähigt sind wie auch das beispielhaft genannte Protein. Dabei kann das funktionelle Analogon sich in anderen Merkmalen
- 45 durchaus unterscheiden. Es kann zum Beispiel eine höhere oder niedrigere Aktivität haben oder auch über weitere Funktionalitäten verfügen. Funktionelle Analoga meint ferner Sequenzen, die für Fusionsproteine bestehend aus einem der bevorzugten Proteine und anderen Proteinen zum Beispiel einem weiteren bevorzugten Protein oder aber auch einer Signalpeptidsequenz kodieren.

Die Expression der Nukleinsäuren unter Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotoren ist in jedem gewünschten Zellkompartiment, wie z.B. dem Endomembransystem, der Vakuole und den Chloroplasten möglich. Durch Nutzung des sekretorischen Weges sind gewünschte Glykosylierungsreaktionen, besondere Faltungen u.ä. möglich. Auch die Sekretion des Zielproteins zur Zelloberfläche bzw. die Sezernierung ins Kulturmedium, beispielsweise bei Nutzung suspensionskultivierter Zellen oder Protoplasten ist möglich. Die dafür notwendigen Targetsequenzen können sowohl in einzelnen Vektorvariationen berücksichtigt werden als auch durch Verwendung einer geeigneten Klonierungsstrategie gemeinsam mit dem zu klonierenden Zielgen in den Vektor mit eingebracht werden. Als Targetsequenzen können sowohl gen-eigene, sofern vorhanden, oder heterologe Sequenzen genutzt werden. Zusätzliche, heterologe zur funktionellen Verknüpfung bevorzugte aber nicht darauf beschränkte Sequenzen sind weitere Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten; sowie Translationsverstärker wie die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15 8693-8711) und dergleichen. Das Verfahren, an sich nicht in den Plastiden lokalisierte Proteine, gezielt in die Plastiden zu transportieren, ist beschrieben (Klosgen RB & Weil JH (1991) Mol Gen Genet 225(2):297-304; Van Breusegem F et al. (1998) Plant Mol Biol 38(3):491-496). Bevorzugte Sequenzen sind

- a) kleine Untereinheit (SSU) der Ribulosebisphosphatcarboxylase (Rubisco ssu) aus Erbse, Mais, Sonnenblume
- b) Transitpeptide abgeleitet von Genen der pflanzlichen Fettsäurebiosynthese wie das Transitpeptid des plastidären "Acyl Carrier Protein" (ACP), die Stearyl-ACP-Desaturase, β -Ketoacyl-ACP Synthase oder die Acyl-ACP-Thioesterase
- c) das Transitpeptid für GBSSI ("Starch Granule Bound Starch Synthase I")
- d) LHCP II Gene.

Die Zielsequenzen können mit anderen, von dem Transitpeptid kodierenden Sequenzen verschiedenen, Targeting-Sequenzen verknüpft sein, um eine subzelluläre Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten zu gewährleisten. Ferner können Translationsverstärker wie die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen zum Einsatz kommen.

Dem Fachmann ist ferner bekannt, dass er die oben beschriebenen Gene nicht direkt unter Verwendung der für diese Gene kodierenden Nukleinsäuresequenzen exprimieren oder zum Beispiel durch anti-sense reprimieren muss. Er kann auch zum Beispiel künstliche Transkriptionsfaktoren vom Typ der Zinkfingerproteine verwenden (Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(4):1495-500). Diese Faktoren lagern sich in den regulatorischen Bereichen der zu exprimierenden oder zu reprimierenden endogenen Gene an und bewirken, je nach Gestaltung des Faktors, eine Expression oder Repression des endogenen Gens. So kann man die gewünschten

20

Effekte auch durch Expression eines entsprechenden Zinkfinger-Transkriptionsfaktors unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren erreichen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können ebenso zur Unterdrückung bzw. Reduktion von Replikation oder/und Translation von Zielgenen durch "Gene Silencing" eingesetzt werden.

- 10 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können auch eingesetzt werden, um Nukleinsäuren zu exprimieren, die sogenannte "antisense" Effekte vermitteln und so beispielsweise zur Verminderung der Expression eines Zielproteins befähigt sind.

Bevorzugte Gene bzw. Proteine, deren Suppression einen vorteilhaften Phänotyp bedingt, umfassen beispielsweise, aber nicht einschränkend:

- 15 a) Polygalakturonase zur Verhinderung von Zellabbau und "Matschig"-werden von Pflanzen und Früchten beispielsweise Tomaten. Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die des Polygalakturonase-Gens der Tomate (GenBank Acc.-No.: X14074) oder dessen Homologe aus anderen Gattungen und Arten verwendet.
- 20 b) Verminderung der Expression von allergenen Proteinen wie beispielsweise beschrieben bei Tada Y et al. (1996) FEBS Lett 391(3):341-345 oder Nakamura R (1996) Biosci Biotechnol Biochem 60(8):1215-1221.
- 25 c) Veränderung der Blütenfarbe durch Suppression der Expression von Enzymen der Anthocyanbiosynthese. Entsprechende Vorgehensweisen sind beschrieben (beispielsweise bei Forkmann G, Martens S. (2001) Curr Opin Biotechnol 12(2):155-160). Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die der Flavonoid-3'-hydroxylase (GenBank Acc.-No.: AB045593), der Dihydroflavanol-4-reduktase (GenBank Acc.-No.: AF017451), der Chalconisomerase (GenBank Acc.-No.: AF276302), der Chalconsynthase (GenBank Acc.-No.: AB061022), der Flavanone-3-beta-hydroxylase (GenBank Acc.-No.: X72592) oder der Flavone-synthase II (GenBank Acc.-No.: AB045592) oder deren Homologe aus anderen Gattungen und Arten verwendet.
- 30
- 35 d) Verschiebung des Amylose/Amylopektingehaltes in Stärke durch Suppression des Verzweigungsenzyms Q, das für die α -1,6-glykosidische Verknüpfung verantwortlich ist. Entsprechende Vorgehensweisen sind beschrieben (beispielsweise bei Schwall GP et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):551-554). Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die des Starch branching enzyme II der Kartoffel (GenBank Acc.-No.: AR123356; US 6,169,226) oder dessen Homologe aus anderen Gattungen und Arten verwendet.
- 40

- 45 Eine "antisense" Nukleinsäure meint zunächst eine Nukleinsäuresequenz die ganz oder teilweise zu zumindest einem Teil des "sense"-Stranges besagten Zielproteins komplementär ist. Dem Fachmann ist bekannt, dass er alternativ die cDNA oder das korrespondierende Gen als Ausgangsmatrize für entsprechende antisense-Konstrukte verwenden kann. Bevorzugt ist die "antisense" Nukleinsäure komplementär zu dem kodierenden Bereich des Zielproteins oder einem Teil desselben. Die "antisense"

Nukleinsäure kann aber auch zu der nicht-kodierenden Region oder einem Teil derselben komplementär sein. Ausgehend von der Sequenzinformation zu einem Zielprotein, kann eine antisense Nukleinsäure unter Berücksichtigung der Basenpaarregeln von Watson und Crick in der dem Fachmann geläufigen Weise entworfen werden. Eine antisense Nukleinsäure kann komplementär zu der gesamten oder einem Teil der Nukleinsäuresequenz eines Zielproteins sein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die antisense Nukleinsäure ein Oligonukleotid mit einer Länge von zum Beispiel 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotiden.

Die antisense Nukleinsäure umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform α -anomere Nukleinsäuremoleküle. α -Anomere Nukleinsäuremoleküle bilden besondere doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen im Unterschied zu den normalen β -Einheiten die Stränge parallel zu einander verlaufen (Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6625-6641).

Ebenso umfasst ist die Verwendung der oben beschriebenen Sequenzen in sense-Orientierung, was wie dem Fachmann geläufig ist, zu einer Kosuppression führen kann. Die Expression von sense-RNA zu einem endogenen Gen kann dessen Expression vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Goring et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1770-1774; Smith et al. (1990) *Mol Gen Genet* 224:447-481; Napoli et al. (1990) *Plant Cell* 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) *Plant Cell* 2:291-299). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich.

Ganz besonders bevorzugt ist auch die Verwendung von Verfahren wie der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"). Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt und im Detail beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) *Plant Mol Biol* 43:401-415; Fire A. et al (1998) *Nature* 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitate beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Hier wird durch gleichzeitige Einbringung von Strang- und Gegenstrang eine hocheffiziente Unterdrückung nativer Gene bewirkt.

Vorteilhaft kann die antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA Sequenzen, die gekoppelt an die antisense Sequenzen, die Zielsequenzen katalytisch spalten (Tanner NK. *FEMS Microbiol Rev.* 1999; 23 (3):257-75). Dies kann die Effizienz einer anti-sense Strategie erhöhen. Die Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in EP-A1 0 291 533, EP-A1 0 321 201 und EP-A1 0 360 257. Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei Steinecke (Ribozymes, *Methods in Cell Biology* 50, Galbraith et al. eds. Academic Press, Inc. (1995), 449-460) beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al., *Plant Mol Biol.* 1992; 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al., *Mol Gen Genet.* 1994 Mar;242(6):653-657). Beispielhaft sind "hammerhead"-Ribozyme zu nennen (Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591). Bevorzugte Ribozyme basieren auf Derivaten der Tetrahymena L-19

22

IVS RNA (US 4,987,071; US 5,116,742). Weitere Ribozyme mit Selektivität für eine L119 mRNA können selektioniert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

- 5 In einer weiteren Ausführungsform kann Verminderung der Zielprotein-Expression unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen bewirkt werden, die komplementär zu regulativen Elementen der Zielprotein-Gene sind, mit diesen eine triple-helikale Struktur ausbilden und so die Gen-Transkription verhindern (Helene C (1991) Anti-cancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; 10 Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

15 Die erfindungsgemäßen bidirektionalen Promotoren sind besonders vorteilhaft, wenn er für die Regulation zweier Enzyme eines Stoffwechselweges eingesetzt wird. Beispielsweise kann die 2'-Methyl-6-phytylhydroquinon-methyltransferase und die Homogentisatphytylpyrophosphattransferase gleichzeitig über einen der erfindungsgemäßen bidirektionalen Promoter exprimiert werden, was einen Anstieg von Tocopherolen bewirkt. Weiterhin führt die Hemmung der Homogentisatdioxygenase (beispielsweise über die Expression einer korrespondierenden dsRNA) und die Überexpression der Tyrosinaminotransferase zu einer Steigerung des Tocopherolgehaltes. Im Carotinoidstoffwechsel führt die Hemmung der ϵ -Zyklase und die Überexpression der β -Zyklase 20 zu einer Veränderung des Gehaltes von α -Carotin und β -Carotin.

25 Es ist möglich postranskriptionellen „Silencing“-Effekte durch parallele Hemmung der Transkription des SDE3 Gens und Überexpression des rekombinanten Proteins zu verhindern (WO 02/063039).

30 Auch immunologisch aktive Teilen von Antikörpern können unter Verwendung der erfindungsgemäßen Promotoren vorteilhaft exprimiert werden. So kann beispielsweise in die eine Richtung die schwere Kette eines IgG1 Antikörpers und in die andere Richtung die leichte Kette exprimiert werden. Nach Translation bilden beide einen funktionellen Antikörper (WO 02/101006).

35 Weiterhin können gleichzeitig stressbezogene Ionentransporter (WO 03/057899) zusammen mit Herbizidgenen exprimiert werden, um die Toleranz gegen Umwelteinflüsse zu erhöhen.

40 Viele Enzyme bestehen aus zwei oder mehreren Untereinheiten, die beide notwendig für die Funktion sind. Mittels eines der erfindungsgemäßen, bidirektionalen Promotoren ist es möglich, zwei Untereinheiten gleichzeitig zu exprimieren. Ein Beispiel dafür ist die Überexpression der α - und der β - Untereinheit des Follikel stimulierendes menschlichen Hormons.

45 Für die Etablierung von Transformationssystemen ist ein Konstrukt bestehend aus einem Gen für eine Selektionsmarker und einem Reportergen besonders wertvoll, wenn sie durch diesen bidirektionalen Promotor reguliert werden.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten und die von ihnen abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung,

Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder von diesen abgeleitete Vektoren oder Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

5 a) Reportergene

- 10 Reportergene oder -proteine kodieren für leicht quantifizierbare Proteine und gewährleisten über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz, des Expressionsortes oder -zeitpunktes (Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44). Beispielhaft sind zu nennen:
- 15 - "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffell SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997; Sheen et al.(1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al.(1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al.(1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228).
 - 20 - Chloramphenicoltransferase (Fromm et al. (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:5824-5828),
 - 25 - Luziferase (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414; Ow et al. (1986) Science, 234:856-859); erlaubt Biolumineszenzdetektion.
 - 30 - β -Galactosidase, kodiert für ein Enzym für das verschiedenen chromogene Substrate zur Verfügung stehen.
 - 35 - β -Glucuronidase (GUS) (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) oder das uidA Gen, das ein Enzym für verschiedene chromogene Substrate kodiert.
 - 40 - R-Locus Genprodukt:Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht (Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium 11:263-282, 1988).
 - 45 - β -Lactamase (Sutcliffe (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:3737-3741), Enzym für verschiedene chromogene Substrate (z.B. PADAC, ein chromogenes Cephalosporin).
 - xylE Genprodukt (Zukowsky et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:1101-1105), Catecholdioxygenase, die chromogene Catechole umsetzen kann.
 - Alpha-Amylase (Ikuta et al. (1990) Bio/Technol. 8:241-242).
 - Tyrosinase (Katz et al.(1983) J Gen Microbiol 129:2703-2714), Enzym, das Tyrosin zu DOPA und Dopaquinon oxidiert, die infolge das leicht nachweisbare Melanin bilden.

- Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), kann in der Calcium-sensitiven Biolumineszenzdetektion verwendet werden.

5

- b) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel *E. coli* gewährleisten. Beispielfhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

10

- c) Elemente zum Beispiel "Bordersequenzen", die einen Agrobakterien-vermittelten Transfer in Pflanzenzellen für die Übertragung und Integration ins Pflanzen-genom ermöglichen, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

15

- d) Multiple Klonierungsregionen (MCS) erlauben und erleichtern die Insertion eines oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen.

20

Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt, um zu einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zu gelangen. Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt beispielsweise durch Fusion eines der erfindungsgemäßen Promotoren (oder eines funktionellen Äquivalentes oder funktionell äquivalenten Teils gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 oder eines funktionellen Äquivalentes mit einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, gegebenenfalls einer für eine Transitpeptid kodierenden Sequenz, vorzugsweise ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid, welches vorzugsweise zwischen dem Promotor und der jeweiligen Nukleinsäuresequenz angeordnet ist, sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken (wie oben beschrieben).

25

30

35

Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promotor, ohne dass er zuvor mit einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft wurde, zum Beispiel über eine gezielte homologe Rekombination oder eine zufällige Insertion in ein Wirtsgenom eingeführt wird, dort regulatorische Kontrolle über mit ihm dann funktionell verknüpfte Nukleinsäuresequenzen übernimmt und die transgene Expression derselben steuert. Durch Insertion des Promotors - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor eine für ein bestimmtes Polypeptid kodierende Nukleinsäure erhält man eine erfindungsgemäße Expressionskassette, welche die Expression des bestimmten Polypeptides in der Pflanze steuert. Ferner kann die Insertion des Promotors auch derart erfolgen, dass antisense-RNA zu der für ein bestimmtes Polypeptid kodierenden Nukleinsäure exprimiert wird. Damit wird die Expression des bestimmten Polypeptides in Pflanzen herunterreguliert oder ausgeschaltet.

40

45

Analog kann auch eine transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz zum Beispiel durch eine homologe Rekombination hinter den endogenen, natürlichen Promotor platziert werden, wodurch man eine erfindungsgemäße Expressionskassette erhält, welche die Expression der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz steuert.

Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die die oben beschriebenen Expressionskassetten enthalten. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein.

5

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw. - oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen.

10

Unter Organismus, Ausgangs- oder Wirtsorganismen werden prokaryotische oder eukaryotische Organismen, wie beispielsweise Mikroorganismen oder pflanzliche Organismen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

15

Bevorzugte Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung *Synechocystis*. Bevorzugt sind vor allem Mikroorganismen, welche zur Infektion von Pflanzen und damit zur Übertragung der erfindungsgemäßen Kassetten befähigt sind. Bevorzugte Mikroorganismen sind solche aus der Gattung *Agrobacterium* und insbesondere der Art *Agrobacterium tumefaciens*.

20

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*. Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria* oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

25

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

30

35

Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugte Wirtsorganismen für die Herstellung transgener Pflanzen. Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Carophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cruciferae*, *Cucurbitaceae*, *Labiatae*, *Leguminosae*, *Papilionoideae*, *Liliaceae*, *Linaceae*, *Malvaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Saxifragaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Sterculiaceae*, *Tetragoniaceae*, *Theaceae*, *Umbelliferae*.

40

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

45

26

Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- 5 - Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- 10 - Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv-Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana und andere mehr,
- 15 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr
- 20 - Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffestrauch) und andere mehr,
- Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine) sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,
- 25 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakaostrauch) und andere mehr,
- 30 - Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,
- 35 - Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Sellerie) und andere mehr; und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Pfeffer) und andere mehr,

sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf (Flachs), Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.

- 40 Bevorzugt sind Nicotiana tabacum, Tagetes erecta und Calendula officinalis sowie alle Gattungen und Arten, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, wie die beschriebenen Getreidearten, oder sich zur Herstellung von Ölen eignen, wie Ölsaaten (wie Raps), Nussarten, Soja, Sonnenblume, Kürbis und Erdnuss.

- 45 Am meisten bevorzugt sind alle Pflanzen der Familie der Brassicaceae, ganz besonders die Brassica Arten wie Brassica napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor

(Broccoli) und weitere Kohllarten; sowie der Gattung *Arabidopsis*, ganz besonders die Art *thaliana*.

5 Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen oder Cyanobakterien, sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Insbesondere bevorzugt sind, Algen wie *Chlorophyceae*, *Phaeophyceae*, *Rhodophyceae*, *Myxophyceae*, *Xanthophyceae*, *Bacillariophyceae* (Diatomeen) und *Euglenophyceae*.

10 Die Herstellung eines transformierten Organismus oder einer transformierten Zelle erfordert, dass die entsprechende DNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). So kann die DNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch
15 Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete
20 Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden.

25 Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger
30 Lösung und die Mikroinjektion.

35 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Diese Stämme enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Ri Plasmid), das auf die Pflanze nach *Agrobacterium*-Infektion übertragen wird. Ein Teil dieses Plasmids, genannt T-DNA (transferred DNA), wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert.

40 Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone, diploide Pflanzenzellen geeignet, wohingegen die direkten Transformationstechniken sich für jeden Zelltyp eignen.

Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in Zellen, bevorzugt in pflanzliche Zellen, kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden.

45 In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Transformationstechniken sind für verschiedene monokotyle und dikotyle pflanzliche Organismen beschrieben. Ferner stehen verschiedene mögliche Plasmidvektoren für die Einführung fremder Gene in Pflanzen zur Verfügung, die in der Regel einen Replikationsursprung für eine Vermehrung in *E.coli* und ein Markergen für eine Selektion transformierter Bakterien enthalten. Beispiele sind pBR322, pUC Reihe, M13mp Reihe, pACYC184 etc.

Die Expressionskassette kann in den Vektor über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in *E.coli* eingeführt. Korrekt transformierte *E.coli* werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

Transformierte Zellen d.h. solche, welche die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide zu verleihen vermag. Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin verleiht (Rathore KS et al., Plant Mol Biol. 1993 Mar;21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht.

Je nach Methode der DNA-Einführung können weitere Gene auf dem Vektorplasmid erforderlich sein. Werden *Agrobacteria* verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wenn zum Beispiel ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden. Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter *Agrobacteria* und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle

erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden.

Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; Fraley et al. (1986) CRC Crit. Rev. Plant. Sci., 4:1-46 and An et al. (1985) EMBO J. 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. U.S.A.).

Für den Transfer der DNA in die pflanzliche Zelle werden pflanzliche Explantate mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert. Ausgehend von infiziertem Pflanzenmaterial (z.B. Blatt-, Wurzel- oder Stengelteile, aber auch Protoplasten oder Suspensionen von Pflanzenzellen) können ganze Pflanzen unter Verwendung eines geeigneten Mediums, das zum Beispiel Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, regeneriert werden. Die erhaltenen Pflanzen können dann auf die Präsenz der eingeführten DNA, hier der erfindungsgemäßen Expressionskassette, durchmustert werden. Sobald die DNA in das Wirtsgenom integriert ist, ist der entsprechende Genotyp in der Regel stabil und die entsprechende Insertion wird auch in den Nachfolgenerationen wiedergefunden. In der Regel enthält die integrierte Expressionskassette einen Selektionsmarker (s.o.). Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Rep 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jones et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von Kung SD & Wu R, Academic Press (1993), S.128 - 143 sowie in Potrykus I (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42:205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f.).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Nukleinsäuren kann beispielsweise *in vitro* durch Sprossmeristemvermehrung unter Verwendung einer der oben beschriebenen Selektionsmethoden ermittelt werden.

Erfindungsgemäß sind ferner von den oben beschriebenen transgenen Organismen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile – wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc., und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte.

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Aufbereitung als Nahrungsmittel oder Futtermittel verwendet werden.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile – wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.- , und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

10

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen wobei ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten oder Vektoren transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder die Biosynthese der gewünschten Feinchemikalie katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte Feinchemikalie aus dem Zuchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Zuchtungsmedium erfolgt mittels der dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakzzinen ist beschrieben bei Hood EE, Jilka JM (1999). Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) .Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

15

20

25

Sequenzen

- 5 1. SEQ ID NO: 1 Bidirektionaler Promotor aus *Arabidopsis thaliana*. Intergenische Region zwischen dem putativen FD-Gen und dem putativem OASTL Gen bis jeweils vor die angenommenen Transkriptionsstarts.
- 10 2. SEQ ID NO: 2 Bidirektionaler Promotor aus *Arabidopsis thaliana* einschließlich der 5'-untranslatierten Regionen des putativen FD-Gen und des putativen OASTL Gen bis jeweils vor die ATG-Start-Codons. Im Vergleich zu der nativen Sequenz umfasst vorliegende Sequenz ein zusätzliches C an Position 4 gegenüber der nativen *Arabidopsis*-Sequenz durch die Einführung einer BamHI Erkennungssequenz.
- 15 3. SEQ ID NO: 3 Sequenz des Plasmids pUH200. Das GUS Gen wird in Richtung des FD Gens exprimiert, das nptII-Gen in Richtung des OASTL Gens.
- 20 4. SEQ ID NO: 4 Sequenz des Plasmids pUH201. Das GUS Gen wird in Richtung des OASTL Gens exprimiert, das nptII-Gen in Richtung des FD Gens.
- 25 5. SEQ ID NO: 5 Oligonukleotid-Primer pFD3
5'-acggatccgagagacagagagacggagacaaaa-3'
6. SEQ ID NO: 6 Oligonukleotid-Primer pFD4 5'-gcggatccaagcttcactgcttaaattc-3'

30 Beschreibung der Abbildungen

- 35 Fig. 1: Schematische Darstellung der bidirektionalen Einheit in den Vektoren UH200 und UH201. RB: Rechte Grenze („Border“) der *Agrobacterium* T-DNA; CATpA: Terminators des Cathepsin D Inhibitor; nptII: Neomycinphosphotransferase II Gen (Kanamycin-Resistenz-Gen); FD: Intergenische Region zwischen FD und OASTL Gen (+/- geben die Leserichtung des FD-Gens an); GUS: β -Glucuronidase-Gen; 35SpA: Terminator des 35S CaMV Gens; LB: Linke Grenze („Border“) der *Agrobacterium* T-DNA.
- 40 Fig. 2: Analyse der GUS Aktivität in Blättern transgener Rapspflanzen transformiert mit UH 200 (Orientierung des Ferredoxingens) bzw. UH 201 (Orientierung des OASTL Gens) im Vergleich zu Wildtyp (WT) Pflanzen. Gezeigt sind die Ergebnisse verschiedener Linien von UH200 bzw UH201 transformierter Raps-Pflanzen (gekennzeichnet durch Nummer der jeweiligen-Linie auf der x-Achse).
- 45 Die GUS-Aktivität ist pMol Methylumbelliferon (MU) / mg (Protein) min angegeben.

Beispiele

Allgemeine Methoden:

- 5 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophoresen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformati-
10 on von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc
15 Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

Beispiel 1: Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*, Tabak und Raps

- 20 Die genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana*, Tabak und Raps wurde mithilfe des DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen Kat. No. 60106 entsprechend der Vorschrift isoliert.

Beispiel 2: Transformation von Tabak und Raps

- 25 Die Transformation von Tabak erfolgte über Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* gemäß der von Horsch entwickelten Methode (Horsch et al. (1985) Science 227: 1229-1231). Alle zur Transformation verwendeten Konstrukte wurden anhand der Gefrier/Tau-Methode (wiederholtes Auftauen und Einfrieren) in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Die das gewünschte Konstrukt enthaltenden *Agrobacterium*-Kolonien
30 wurden auf YEB Medium (1% Rinderextrakt (Difco), 0,5% Caseinenzym-hydrolysat, 0,1% Hefeextrakt (Duchefa), 0,5% Saccharose, 2 mM MgSO₄, 1,5% Agar) -Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 40 µg/ml Gentamycin, 100 µg/ml Spectinomycin und 25 µg/ml Rifampicin selektioniert.

- 35 Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien im gleichen Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden
40 Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakterienlösung gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog (1962) Physiol Plant 15:473ff.) mit 2% Saccharose und 0,8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Claforan, 1 mg/l Benzylaminopurin
45 (BAP), 0,2 mg/l Naphtyleessigsäure (NAA), 1,6% Glukose und 0,8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

33

Die Transformation von Raps erfolgte mittels der Petiolentransformation nach Moloney et al. (Moloney MM et al. (1989) Plant Cell Rep 8:238-242).

Beispiel 3: Untersuchung zur bidirektionalen Expression des FD Promoters

5

a) PCR Isolierung des FD Promoters aus *Arabidopsis thaliana*

Der putative bidirektionale Promoter wurde mittels PCR aus genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA mit den Primern FD3 und FD4 amplifiziert. Dem Primer FD3 wurden die mit Fettdruck hervorgehobenen Nukleotide für einen BamHI Ort angefügt. Durch Insertion eines C (Fett) wurde im Unterschied zur genomischen Sequenz ein BamHI Ort im Primer FD4 eingeführt.

Primer FD3: (SEQ ID NO: 5)
5'-**acggatcc**gagagacagagagacggagacaaaa-3'

Primer FD4: (SEQ ID NO: 6)
5'-**gcggatcca**agcttcactgcttaaattc-3'

20 Reaktionsansatz:

1µl DNA
37µl H₂O
5µl 10x Puffer
25 1µl FD3 Primer 10µM
1µl FD4 Primer 10µM
4µl dNTP 2,5mM
1µl Pfu Turbo- DNA Polymerase (Stratagene)

30 PCR-Bedingungen:

1 Zyklus mit 5 min. bei 95°C
25 Zyklen mit, 52°C für 1 min., 72°C für 1 min. und 95°C für 30 sec
1 Zyklus mit 72°C für 10 min.,

anschließend Kühlung auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung.

b) Konstruktion der FD:GUS Expressionskassetten

40 Das den FD Promoter enthaltende PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten und in den Vektor pGUSINT37 (SunGene), ebenfalls BamHI gespalten, ligiert. Aus der ungerichteten Klonierung entstanden die beiden Plasmide pFD+GUS und pFD-GUS, in denen das Promoterfragment in jeweils entgegengesetzten Orientierungen vor dem GUS Gen platziert ist. Das Plasmid pFD+GUS enthält den
45 Promoter in der Transkriptionsrichtung des putativen Ferredoxin-Gens, das Plasmid pFD-GUS in der Orientierung des annotierten O-Acetylserin-thiolylase Gens (OASTL, Cystein Synthase).

34

Beispiel 4: Herstellung von Vektoren zur gleichzeitigen Analyse beider Transkriptionsrichtungen des FD Promoters

5 Zur Analyse beider Expressionsrichtungen wurde in zwei Konstrukten die Gene des Selektionsmarkers NptII und des Reporters Glucuronidase unter die Kontrolle des bidirektionalen Promoters gestellt. Dazu wurden die Plasmide pFD+GUS und pFD-GUS mit EcoRI/Sall gespalten und in den Vektor pS5NptIICat (Derivat des pSUN Vektors; WO 02/00900) kloniert. Das resultierende Plasmide UH200 (SEQ ID NO: 3) enthält das GUS Gen unter der Kontrolle der in Richtung des Ferredoxingens wirkenden transkriptionellen Elemente und das NptII Gen unter der Kontrolle des in Richtung OASTL Gen wirkenden transkriptionellen Elemente. Im Plasmid UH201 (SEQ ID NO: 4) befindet sich das GUS Gen unter der Kontrolle der OASTL gerichteten Faktoren und das NptII Gen unter der Kontrolle der das Ferredoxin-Gen steuernden Elemente (siehe Fig.1). Beide Konstrukte wurden in den Agrobakterien-Stamm GV3101[pMP90] 15 transformiert und entsprechend den Protokollen in Tabak und Raps transformiert.

Beispiel: 5 Ergebnisse der Analyse der Kanamycin-Resistenz der transgenen Tabakpflanzen

20 Die selektive Regeneration der Tabakpflänzchen erfolgte auf 100mg/l Kanamycin. 86% der Explantate der mit dem Konstrukt UH200 transformiert waren, entwickelten Sprossknospen. Von den geschnittenen Sprossen bewurzelten sich auf Kanamycin enthaltenden Medium 89%, die nach PCR Analysen alle transgen waren. 70% der Explantate aus dem Transformationsexperiment mit UH201 entwickelten Sprossknospen, von denen 90% sich bewurzelten. Auch hier ergab die PCR Analyse, dass 25 die Pflänzchen das entsprechende Konstrukt enthalten und somit transgen sind. Dieses Beispiel zeigt, dass beide Promotororientierungen in gleicher Weise für die Expression von Selektionsmarkern während selektiver Regeneration von Tabak geeignet sind.

Beispiel 6: Ergebnisse der Analyse der Kanamycin-Resistenz der transgenen Rapspflanzen

35 Die selektive Regeneration der Rapssprosse erfolgte auf 18 mg/l Kanamycin. Die Transformationseffizienz betrug für das Konstrukt UH200 11% und für UH201 10%. Gleichzeitig wurde die Transformationseffizienz unter der Kontrolle des Promotors der Nopaline Synthase mit 8% ermittelt. Dieses Beispiel zeigt, dass die selektive Regeneration sowohl unter der Kontrolle des Promotors in der OASTL Richtung (UH200) als auch in der FD Richtung (UH201) mit dem üblicherweise verwendeten nosP vergleichbar ist. 40

Beispiel 7: GUS-Analyse der Gewebespezifität des bidirektionalen Promoters in den transgenen Tabak und Rapspflanzen.

45 In den transgenen Tabak und Rapspflanzen haben beide Promotororientierungen die gleichen Gewebespezifitäten mit Ausnahme in Pollen gezeigt (Tabelle 1). Während in Raps keine Aktivitäten in den Pollen gefunden wurden, zeigte der Tabakpollen eine deutliche Blaufärbung und damit eine Promoteraktivität. Die GUS Expression reguliert von beider Orientierungen wurde vorwiegend in grünem Gewebe gefunden. In Wurzeln

und Blütenblättern konnte keine Expression nachgewiesen werden. Bereits in sehr jungen Stadien der Samenentwicklung im Raps konnte eine GUS-Aktivität detektiert werden.

Gewebe		A		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
		siL	soL											
Tabak	FD	++	++	-	+	+	++	++	+	+	++	-	+	++
	OASTL	+	+	-	+	+	+	+	+	+	++	-	+	++
Raps	FD	++	++	-	++	nd	+	+	+	+	+	-	+	-

5 Tabelle: 1: Übersicht über die Gewebespezifitäten in Tabak und Raps.

++ hohe Aktivität

+ geringere Aktivität

- keine Aktivität; nd: nicht bestimmt

A Blätter (siL: „Sink“ Blätter; soL: „Source“-Blätter)

10 B Wurzeln

C Samen

D Keimling

E Stängel

F Blütenstiele

15 G Nodien

H Knospe

I Kelchblätter

J Blütenblätter

K Antheren

20 L Pollen.

Zur Verfolgung der Promotoraktivität während der selektiven Regeneration wurden junge Sprosse mit X-Gluc gefärbt. Transgene Sprosse zeigten eine starke Blaufärbung. Dieses Experiment zeigte wieder die gleiche Aktivität des bidirektionalen Promoters in beiden Orientierungen.

Beispiel 8: Quantitative GUS-Analyse des bidirektionalen Promoters in den transgenen Tabakpflanzen

Zur quantitativen Analyse der Stärke des FD Promoters wurde parallel von transgenen Pflanzen beider Konstrukte Blatt und Samenmaterial untersucht. Der quantitative GUS Assay wurde entsprechend der Vorschrift von Jefferson mit MUG und 4-Methylumbelliferon als Standard durchgeführt. In den Samen der Pflanzen beider Orientierungen wurde eine ähnliche Menge an GUS Aktivität detektiert. Im Blattmaterial war die Expression in beiden Richtungen deutlich messbar, in der Intensität jedoch weniger uniform als im Samenmaterial.

Beispiel 9: Quantitative GUS-Analyse des bidirektionalen Promoters in den transgenen Rapspflanzen

Raps wurde - wie oben beschrieben - ebenfalls mit den Konstrukten UH200 und UH201 transformiert. Eine quantitative GUS Analyse von Blattmaterial transgener Rapspflanzen zeigte, dass beide Promotorrichtungen eine gleiche Aktivität zeigten. In Fig. 2 sind die Werte der einzelnen Linien dargestellt. Die Höhe der Expression entspricht den anderen polarer pflanzlicher Promotoren.

Patentansprüche

1. Transgene Expressionskassetten zur Expression von zwei Nukleinsäuresequenzen in einer pflanzlichen Zelle umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,

b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

c) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

d) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenzen heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens einer pflanzlichen Zelle die Expression von zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

i) Aminosäuresequenzen oder

ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

2. Expressionskassette nach Anspruch 1, wobei die beiden transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen unterschiedlich sind und für eine der folgenden Kombinationen kodieren

i) Selektionsmarker und Reporterprotein

ii) Zielprotein und Selektionsmarker oder Reporterprotein

ii) Zwei Zielproteine aus dem gleichen Stoffwechselweg

iii) Sense und antisense RNA

iv) Verschiedene Proteine zur Pathogenabwehr

2

3. Expressionskassette nach Anspruch 1 oder 2, wobei mindestens eine der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen ausgewählt ist aus Nukleinsäuren kodierend für Selektionsmarker, Reportergene, Cellulasen, Chitinasen, Glucanasen, Ribosom-Inaktivierende Proteine, Lysozyme, *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen, α -Amylaseinhibitoren, Proteaseinhibitoren, Lektinen, RNAasen, Ribozymen, Acetyl-CoA-Carboxylasen, Phytasen, 2S Albumin aus *Bertholletia excelsa*, "antifreeze"-Proteinen, Trehalosephosphatsynthasen, Trehalosephosphatphosphatasen, Trehalasen, DREB1A-Faktor, Farnesyltransferasen, Ferritin, Oxalatoxidasen, Calcium-abhängigen Proteinkinasen, Calcineurinen, Glutamatdehydrogenasen, N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450, transkriptioneller Aktivator CBF1, Phytoendesaturasen, Polygalakturonasen, Flavonoid-3'-hydroxylasen, Dihydroflavanol-4-reduktasen, Chalconisomerasen, Chalconsynthasen, Flavanone-3-beta-hydroxylasen, Flavonsynthase II, Verzweigungsenzyms Q, "Starch Branching" Enzyme.
4. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens eine der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus positiven Selektionsmarkern, negativen Selektionsmarkern und Faktoren die einen Wachstumsvorteil gewähren.
5. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 2 oder 4, wobei der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, die eine Resistenz gegen Antibiotika, Metabolismus-Inhibitoren, Herbizide oder Biozide verleihen.
6. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 2, 4 oder 5, wobei der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, die eine Resistenz verleihen gegen Phosphinothricin, Glyphosat, Bromoxynil, Dalapon, 2-Desoxyglucose-6-phosphat, Tetracyclin, Ampicillin, Kanamycin, G 418, Neomycin, Paromomycin, Bleomycin, Zeocin, Hygromycin, Chloramphenicol, Sulfonharnstoff-Herbizide, Imidazolinon-Herbizide.
7. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 2 oder 4 bis 6, wobei der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Phosphinothricinacetyltransferasen, 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasen, Glyphosat-oxidoreduktasen, Dehalogenase, Nitrilasen, Neomycinphosphotransferasen, DOG^R1-Genen, Acetolactatsynthasen, Hygromycinphosphotransferasen, Chloramphenicolacetyltransferasen, Streptomycinadenylyltransferasen, β -Lactamasen, tetA Genen, tetR Genen, Isopentenyltransferasen, Thymidinkinasen, Diphtheriatoxin A, Cytosindeaminase (codA), Cytochrom P450, Haloalkandehalogenasen, iaaH Gene, tms2 Gene, β -Glucuronidasen, Mannose-6-phosphat-Isomerasen, UDP-Galaktose-4-Epimerasen.
8. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

3

9. Transgener nicht-menschlicher Organismus transformiert mit einer transgenen Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder einem transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 8.

5 10. Transgener nicht-menschlicher Organismus nach Anspruch 9 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen und pflanzlichen Organismen.

10 11. Transgener nicht-menschlicher Organismus nach einem der Ansprüche 9 oder 10, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Arabidopsis, Tomate, Tabak, Kartoffeln, Mais, Raps, Weizen, Gerste, Sonnenblumen, Hirse, Rübe, Roggen, Hafer, Zuckerrübe, Bohnengewächse und Soja.

15 12. Zelle, Zellkulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut abgeleitet von einem transgenen nicht-menschlichen Organismus nach einem der Ansprüche 9 bis 11.

20 13. Verfahren zur transgenen Expression von zwei Ribonukleinsäuresequenzen in pflanzlichen Zellen, wobei eine Expressionskassette umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,

25 b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

30 c) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

35 d) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

in mindestens eine pflanzliche Zelle eingebracht wird,

40 wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens besagter pflanzlichen Zelle die Expression besagter zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

45

- i) Aminosäuresequenzen oder
- ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

- 5 14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die beiden transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen unterschiedlich sind und für eine der folgenden Kombinationen kodieren
- 10
 - i) Selektionsmarker und Reporterprotein
 - ii) Zielprotein und Selektionsmarker oder Reporterprotein
 - ii) Zwei Zielproteine aus dem gleichen Stoffwechselweg
 - iii) Sense und antisense RNA
 - iv) Verschiedene Proteine zur Pathogenabwehr
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei mindestens eine der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus Nukleinsäuren wie definiert in einem der Ansprüche 3 bis 7.
- 20 16. Verwendung eines transgenen nicht-menschlichen Organismus nach einem der Ansprüche 9 bis 11 oder von diesem abgeleitete Zellkulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut nach Anspruch 12 zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.
- 25 17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Feinchemikalien Antikörper, Enzyme, pharmazeutisch aktive Proteine, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, natürliche oder synthetische Geschmacks-, Aroma- oder Farbstoffe sind.
- 30 18. Verfahren zur Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in transgenen Organismen nach einem der Ansprüche 9 bis 11 oder von diesen abgeleiteten Zellkulturen, Teilen oder transgenes Vermehrungsgut nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus gezüchtet und das gewünschte Pharmazeutikum oder die gewünschte Feinchemikalie isoliert wird.

Expressionskassetten zur bidirektionalen transgenen Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen

Zusammenfassung

- 5 Die Erfindung betrifft transgene Expressionskassetten zur Expression von zwei Nukleinsäuresequenzen in einer pflanzlichen Zelle umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 10 a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,
- b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor
- 15 gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,
- c) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und
- 20 d) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,
- 25 wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenzen heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens einer pflanzlichen Zelle die Expression von zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für
- 30 i) Aminosäuresequenzen oder
- 35 ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

SEQUENCE LISTING

- <110> SunGene GmbH&Co.KGaA
<120> Expressionskassetten zur bidirektionale transgenen Expression von
5 Nukleinsäuren in Pflanzen
<130> AE 20030535
<160> 6
<170> PatentIn version 3.1
- 10 <210> 1
<211> 429
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
- 15 <220>
<221> promoter
<222> (1)..(429)
<223>
- 20 <400> 1
gtatggaata aaatcttcga atgatgagat atatgatctc tttggtgtca gtcacatggc 60
acacgctatc aatttagaaa aacgcggtgg ttggtcacca gaattactac ttctcgggtct 120
gatttggtca tatccgtatt aagtcgggtt aatattttcc ataactggggg tttgaacatt 180
cggtttcttt ttttcagtta gtccgatttg gagttttgag tatggaaaaa taatactgaa 240
25 tttatttggt caaactgttt tggaaaaaat atttccctta attacgaata taattaaaat 300
tttaaaattc attttattag atcttggtta attcggttta atgcattaat gaatttcgggt 360
ttaagtcgggt tttcggtttt tatgtcccac cactatctac aaccgatgat caaccttata 420
tccgtattc 429
- 30 <210> 2
<211> 836
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
- 35 <220>
<221> promoter
<222> (344)..(772)
<223>
- 40 <220>
<221> Intron
<222> (14)..(281)
<223> 1st intron of OASTL gene
- 45 <220>

<221> 5'UTR
<222> (773)..(836)
<223> 5'UTR of FD gene

5 <220>
<221> 5'UTR
<222> (1)..(343)
<223> 5'-UTR of OASTL gene comprising intron

10 <400> 2
gatccaagct tcactgctta aattcacaaa aagagaaaag taagaccaa ggaataaatc 60
atcctcaaac caaaaacaca tcatacaaaa tcatcaaaca taaatctcca gatgtatgag 120
caccaatcca gttatacaac actcttaaca ccaaatacaac agattttaaca gcgaaataag 180
cttaagccca tacaattatc cgatccaaac aaatataatc gaaaccggca gaggaataag 240
15 caagtgaatc aaaaagtatg ggacgaggaa gaagatgata cctgaatgag aaagtcaata 300
accttgaccc gaatcgtttt gaagaaaatg gagaaaatcg gttgtatgga ataaaatctt 360
cgaatgatga gatatatgat ctctttggtg tcagtcacat ggcacacgct atcaatttag 420
aaaaacgcgg tggttggtca ccagaattac tacttctcgg tctgatttgg tcatatccgt 480
attaagtcgg gttaatatctt tccataactg gggtttgaac attcgggtttc tttttttcag 540
20 ttagtccgat ttggagtttt gagtatggaa aaataatact gaatttatctt gttcaaactg 600
ttttggaaaa aatatctccc ttaattacga atataattaa aattttaaaa ttcatcttat 660
tagatcttgg ttaattcggg ttaatgcatt aatgaatttc ggtttaagtc ggttttcggg 720
ttttatgtcc caccactatc tacaaccgat gatcaacctt atctccgtat tcaccacaaa 780
cagtcatcac tctcacttga cacaaaaact cttttgtctc cgtctctctg tctctc 836

25 <210> 3
<211> 11533
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
30
<220>
<223> Expression vector UH200

<400> 3
35 ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60
ttattctaata aaacgctctt ttctcttagg tttaccggcc aatatatcct gtcaaact 120
gatagttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaca gctatgacca 180
tgattacgcc aagcttgcac gccgatcccc cccactccgc cctacactcg tatatatatg 240
cctaaacctg ccccgcttct catatgtgat attattattt cattattagg tataagatag 300
40 taaacgataa ggaaagacaa tttattgaga aagccatgct aaaatataga tagatatacc 360
ttagcagggtg tttattttac aacataacat aacatagtag ctagccagca ggcaggctaa 420
aacatagtat agtctatctg cagggggtac ggtcgactct agactagtgg atccgtcgaa 480
gctagcttgg gtcccgtca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 540
gaatcgggag cggcgataac gtaaagcacg aggaagcggg cagcccatc gccgccaagc 600
45 tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcgggtccgc cacaccagc 660

	cggccacagt	cgatgaatcc	agaaaagcgg	ccattttcca	ccatgatatt	cggcaagcag	720
	gcatcgccat	gggtcacgac	gagatcctcg	ccgtcgggca	tgcgcgcctt	gagcctggcg	780
	aacagttcgg	ctggcgcgag	cccctgatgc	tcttcgtcca	gatcatcctg	atcgacaaga	840
	ccggcttcca	tccgagtagc	tgtcgcgtcg	atgcgatgtt	tgcgttggtg	gtcgaatggg	900
5	caggtagccg	gatcaagcgt	atgcagccgc	cgcattgcat	cagccatgat	ggatactttc	960
	tcggcaggag	caaggtgaga	tgacaggaga	tcctgccccg	gcacttcgcc	caatagcagc	1020
	cagtcccttc	ccgcttcagt	gacaacgtcg	agcacagctg	cgcaagggaac	gcccgtcgtg	1080
	gccagccacg	atagccgcgc	tgcctcgtcc	tgcagttcat	tcagggcacc	ggacaggtcg	1140
	gtcttgacaa	aaagaaccgg	gcgcccctgc	gctgacagcc	ggaacacggc	ggcatcagag	1200
10	cagccgattg	tctgtttgtc	ccagtcatag	ccgaatagcc	tctccacca	agcggccgga	1260
	gaacctgcgt	gcaatccatc	ttgttcaatc	caagctccca	tgggcccctcg	actagagtcg	1320
	agatccgata	tcgcccgggc	tcgactctag	aggatccaag	cttcactgct	taaattcaca	1380
	aaaagagaaa	agtaagacca	aaggaataaa	tcatcctcaa	acaaaaaca	catcatacaa	1440
	aatcatcaaa	cataaatctc	cagatgtatg	agcaccaatc	cagttataca	acactcttaa	1500
15	caccaaatac	acagatttaa	cagcgaaata	agcttaagcc	catacaatta	tcgcatccaa	1560
	acaaatataa	tcgaaaccgg	cagaggaata	agcxaagtga	tcaaaaagta	tgggacgagg	1620
	aagaagatga	tacctgaatg	agaaagtcaa	taaccttgac	ccgaatcgtt	ttgaagaaaa	1680
	tggagaaaaa	cggttgtatg	gaataaaatc	ttcgaatgat	gagatatatg	atctcttttg	1740
	tgtcagtcac	atggcacacg	ctatcaattt	agaaaaacgc	ggtggttggg	caccagaatt	1800
20	actactttct	ggtctgattt	ggatcatatc	gtattaagtc	cggttaatat	tttcataaac	1860
	tgggggtttg	acattcgggt	tctttttttt	agttagtcgc	atttggagtt	ttgagtatgg	1920
	aaaaataata	ctgaatttat	ttgttcaaac	tgttttggaa	aaaatatttc	ccttaattac	1980
	gaatataatt	aaaattttta	aattcatttt	attagatctt	ggttaattcg	gtttaatgca	2040
	ttaatgaatt	tcggtttaag	tcggtttttc	gtttttatgt	cccaccacta	tctacaaccg	2100
25	atgatcaacc	ttatctccgt	attcaccaca	aacagtcac	actctcactt	gacacaaaaa	2160
	ctctttttgt	tcggtctctc	tgtctctcgc	atccccgggt	aggtcagtc	cttatgttac	2220
	gtcctgtaga	aaccccaacc	cgtgaaatca	aaaaactcga	cggcctgtgg	gcattcagtc	2280
	tggatcgcg	aaactgtgga	attggtcagc	gttggtggga	aagcgcgtta	caagaaagcc	2340
	gggcaattgc	tgtgccagga	gttttttaac	atcaagttcg	ccgatgccag	atattcgtaa	2400
30	ttatgccggc	aacgtcttgg	tatcagcgcc	gaagtcttta	ttccgaaagg	ttgggcaggc	2460
	cagcgtatcg	tgtcgcgttt	cgatgcggtc	actcattacg	gcaaagtgtg	ggtcaataat	2520
	caggaagtga	tggagcatca	gggcggctat	acgccatttg	aagccgatgt	cagcccgat	2580
	gttattgccg	ggaaaagtgt	acgtaagttt	ctgcttctac	ctttgatata	tatataataa	2640
	ttatcattaa	ttagtagtaa	tataatatatt	caaatatttt	tttcaaaata	aaagaatgta	2700
35	gtatatagca	attgcttttc	tgtagtttat	aagtgtgtat	attttaattt	ataacttttc	2760
	taatatatga	ccaaaatttg	ttgatgtgca	ggtatcaccg	tttgtgtgaa	caacgaactg	2820
	aactggcaga	ctatcccggc	gggaatggtg	attaccgacg	aaaacggcaa	gaaaaagcag	2880
	tcttacttcc	atgatttctt	taactatgcc	ggaatccatc	gcagcgtaat	gctctacacc	2940
	acgccgaaca	cctgggtgga	cgatatcacc	gtggtgacgc	atgtcgcgca	agactgtaac	3000
40	cagcgcgtct	ttgactggca	ggtggtggcc	aatggtgatg	tcagcgttga	actgcgtgat	3060
	gcggatcaac	aggtggttgc	aactggacaa	ggcactagcg	ggactttgca	agtgggtgaat	3120
	ccgcacctct	ggcaaccggg	tgaagggttat	ctctatgaac	tgtgcgtcac	agccaaaagc	3180
	cagacagagt	gtgatatact	cccgttctgc	gtcggcatcc	ggtcagtggc	agtgaagggc	3240
	gaacagttcc	tgattaacca	caaaccgttc	tactttactg	gctttgggtc	tcatgaagat	3300
45	gcggacttac	gtggcaagg	attcgataac	gtgctgatgg	tgcacgacca	cgcattaatg	3360

	gactggattg	gggccaactc	ctaccgtacc	tgcattacc	cttacgctga	agagatgctc	3420
	gactgggcag	atgaacatgg	catcggtgg	attgatgaaa	ctgctgctgt	eggctttaac	3480
	ctctcttttag	gcattgggtt	cgaagcgggc	aacaagccga	aagaactgta	cagcgaagag	3540
	gcagtcaacg	gggaaactca	gcaagcgcac	ttacaggcga	ttaaagagct	gatagcgcgt	3600
5	gacaaaaacc	acccaagcgt	ggtgatgtgg	agtattgcca	acgaaccgga	taccggtccg	3660
	caagtgcacg	ggaatatttc	gccactggcg	gaagcaacgc	gtaaactcga	cccgcgcgt	3720
	ccgatcacct	gcgtcaatgt	aatgttctgc	gacgctcaca	ccgataccat	cagcgatctc	3780
	tttgatgtgc	tgtgcctgaa	ccgttattac	ggatgggtatg	tccaaagcgg	cgatttggaa	3840
	acggcagaga	aggtactgga	aaaagaactt	ctggcctggc	aggagaaact	gcatcagccg	3900
10	attatcatca	ccgaatacgg	cgtggatacg	ttagccgggc	tgcactcaat	gtacaccgac	3960
	atgtggagtg	aagagtatca	gtgtgcatgg	ctggatatgt	atcaccgcgt	ctttgatcgc	4020
	gtcagcgccg	tcgtcgggtg	acaggtatgg	aatttcgccg	atcttgccgac	ctcgcaaggc	4080
	atattgcgcg	ttggcggtaa	caagaaaggg	atcttccactc	gcgaccgcaa	accgaagtcg	4140
	gcggcttttc	tgctgcaaaa	acgctggact	ggcatgaact	tcggtgaaaa	accgcagcag	4200
15	ggaggcaaac	aatgaatcaa	caactctcct	ggcgccaccat	cgtcggctac	agcctcggga	4260
	attgctaccg	agctcggtag	ccggcgcaaa	aatcaccagt	ctctctctac	aatctatct	4320
	ctctctatct	ttctccagaa	taatgtgtga	gtagttccca	gataagggaa	ttagggttct	4380
	tatagggttt	cgctcatgtg	ttgagcatat	aagaaaccct	tagtatgtat	ttgtatttgt	4440
	aaaatacttc	tatcaataaa	atcttctaatt	cctaaaacca	aaatccagtg	accgggtacc	4500
20	gagctcgaat	tcaactggccg	tcgtttttaca	acgactcagc	agcttgacag	gaggcccgat	4560
	ctagtaacat	agatgacacc	gcgcgcgata	atcttacccta	gtttgcgcgc	tatatatttgt	4620
	tttctatcgc	gtattaaatg	tataattgcg	ggactctaata	cataaaaacc	catctcataa	4680
	ataacgtcat	gcattacatg	ttaattatta	catgcttaac	gtaattcaac	agaaattata	4740
	tgataatcat	cgcaagaccg	gcaacaggat	tcaatcttaa	gaaactttat	tgccaaatgt	4800
25	ttgaacgatc	ggggatcatc	cggttctgtg	gcgggaactc	cacgaaaata	tccgaacgca	4860
	gcaagatcgg	tcgatcgact	cagatctggg	taactggcct	aactggcctt	ggaggagctg	4920
	gcaactcaaa	atccctttgc	caaaaacca	catcatgcc	tccaccatgc	ttgtatccag	4980
	ccgcgcgcaa	tgtaccccg	gctgtgtatc	ccaaagcctc	atgcaaccta	acagatggat	5040
	cgtttggaag	gcctataaca	gcaaccacag	acttaaaacc	ttgcgcctcc	atagacttaa	5100
30	gcaaatgtgt	gtacaatgta	gatcctaggc	ccaacctttg	atgcctatgt	gacacgtaaa	5160
	cagtactctc	aactgtccaa	tcgtaagcgt	tcctagcctt	ccagggccca	gcgtaagcaa	5220
	taccagccac	aacaccctca	acctcagcaa	ccaaccaagg	gtatctatct	tgcaacctct	5280
	ctaggtcac	aatccactct	tgtgggtgtt	gtggctctgt	cctaaagtcc	actgtagacg	5340
	tctcaatgta	atggttaacg	atgtcacaaa	ccgcggccat	atcggtctgt	gtagctggcc	5400
35	taatctcaac	tggctctctc	tccggagaca	tgctgagatt	atctggattg	agagtgaata	5460
	tgagactcta	attggatacc	gaggggaatt	tatggaacgt	cagtggagca	tttttgacaa	5520
	gaaatatttg	ctagctgata	gtgaccttag	gcgacttttg	aacgcgcaat	aatggtttct	5580
	gacgtatgtg	cttagctcat	taaactccag	aaacccgcgg	ctgagtggct	ccttcaacgt	5640
	tgcggttctg	tcagttccaa	acgtaaaacg	gcttgtcccg	cgatcatcggc	gggggtcata	5700
40	acgtgactcc	cttaattctc	cgctcatgat	cagattgtcg	tttccgcct	tcagtttaaa	5760
	ctatcagtgt	ttgacaggat	cctgcttggt	aataattgtc	attagattgt	ttttatgcat	5820
	agatgcactc	gaaatcagcc	aatttttagac	aagtatcaaa	cgatgttaa	ttcagtacat	5880
	taaagacgtc	cgcaatgtgt	tattaagttg	tctaagcgtc	aatttgttta	caccacaata	5940
	tatcctgcc	ccagccagcc	aacagctccc	cgaccggcag	ctcggcacia	aatcaccacg	6000
45	cgttaccacc	acgcggcg	gccgcgtggt	gttgaccgtg	ttcgccggca	ttgccgagtt	6060

cgagcggttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcggggcg gagggcgcca agggccgagg 6120
cgtgaagttt ggcccccgcc ctaccctcac cccggcacag atcgcgacg cccgcgagct 6180
gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggtgca ctgcttggcg tgcacgctc 6240
gaccctgtac cgcgcacttg agcgcagcga ggaagtgcg cccaccgagg ccaggcggcg 6300
5 cgggtgccttc cgtgaggacg cattgaccga ggccgacgcc ctggcgggcg ccgagaatga 6360
acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc aggacgaacc gtttttcatt 6420
accgaagaga tgcaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg tgttcgagcc gcccgcgcac 6480
gtctcaaccg tgcggctgca tgaaatcctg gccggtttgt ctgatgccaa gctggcggcc 6540
tggccggcca gcttggccgc tgaagaaacc gagcgccgcc gtctaaaaag gtgatgtgta 6600
10 tttgagtaaa acagcttgcg tcatcgcggtc gctgcgtata tgatgcgatg agtaaataaa 6660
caaatacgca aggggaacgc atgaagggtta tcgctgtact taaccagaaa ggccgggtcag 6720
gcaagacgac catcgcaacc catctagccc gcgccttgca actcgccggg gccgatgttc 6780
tgtagtgcga ttccgatccc cagggcagtg cccgcgattg ggccggccgtg ccggaagatc 6840
aaccgctaac cgttgcggc atcgaccgcc cgacgattga ccgcgacgtg aaggccatcg 6900
15 gccggcgcgca ctctgtagtg atcgacggag cgcgccaggc ggccggacttg gctgtgtccg 6960
cgatcaaggc agccgacttc gtgctgattc cgggtgcagcc aagcccttac gacatatggg 7020
ccaccgccga cctgggtggag ctgggttaagc agcgcattga ggtcacggat ggaaggctac 7080
aagcggcctt tgtcgtgtcg cgggcgatca aaggcacgcg catcgccggg gaggttgccg 7140
aggcgctggc cgggtacgag ctgcccattc ttgagtcccg tatcacgcag cgctgagct 7200
20 acccaggcac tgcgcgcgcc ggcacaaccg ttcttgaatc agaacccgag ggcgacgctg 7260
cccgcgaggt ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaaa actcatttga gttaatgagg 7320
taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcc ggccgtccga gcgcacgcag 7380
cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcca gccatgaagc gggtaactt 7440
tcagttgccg gcggaggatc acaccaagct gaagatgtac gcggtacgcc aaggcaagac 7500
25 cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca gagtaaatga gcaaatgaat 7560
aaatgagtag atgaatttta gcggctaaag gaggcggcat ggaaaatcaa gaacaaccag 7620
gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg cggttggcca ggcgtaagcg 7680
gctgggttgt ctgccggccc tgcaatggca ctggaacccc caagcccgag gaatcggcgt 7740
gagcggctgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg gcgctgggtg atgacctggt 7800
30 ggagaagttg aaggccgcgc aggcgcgcca gcggcaacgc atcgaggcag aagcacgccc 7860
cgggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa gaatcccggc aaccgcccgc 7920
agccggtgcg ccgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac gagcaaccag attttttcgt 7980
tccgatgctc tatgacgtgg gcaccgcgca tagtcgcagc atcatggacg tggccgtttt 8040
ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc cgctacgagc ttccagacgg 8100
35 gcacgtagag gtttccgcag ggccggcccg catggccagt gtgtgggatt acgacctggt 8160
actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga taccgggaag ggaagggaga 8220
caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta ctcaagttct gccggcgagc 8280
cgatggcgga aagcagaaag acgacctggt agaaacctgc attcgggtta acaccacgca 8340
cgttgccatg cagcgtagca agaaggccaa gaacggccgc ctggtgacgg tatccgaggg 8400
40 tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa accgggcggc cggagtacat 8460
cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca gaaggcaaga acccgagcgt 8520
gctgacgggt caccocgatt actttttgat cgatcccggc atcgcccggt ttctctaccg 8580
cctggcacgc cgcgccgag gcaaggcaga agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga 8640
acgcagtggc agcgccggag agttcaagaa gttctgtttc accgtgcgca agctgatcgg 8700
45 gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg gggcaggctg gcccgatcct 8760

	agtcattgccc	taccgcaacc	tgatcgaggg	cgaagcatcc	gccgggttcct	aatgtacgga	8820
	gcagatgcta	gggcaaattg	ccctagcagg	ggaaaaaggt	cgaaaagggtc	tctttcctgt	8880
	ggatagcacg	tacattggga	acccaaagcc	gtacattggg	aaccggaacc	cgtacattgg	8940
	gaacccaaag	ccgtacattg	ggaaccggtc	acacatgtaa	gtgactgata	taaaagagaa	9000
5	aaaaggcgat	ttttccgcct	aaaactcttt	aaaacttatt	aaaactctta	aaaccgcct	9060
	ggcctgtgca	taactgtctg	gccagcgcac	agccgaagag	ctgcaaaaag	cgcctaccct	9120
	tcggtcgctg	cgctccctac	gccccgccgc	ttcgcgtcgg	cctatcgagg	ccgctggccg	9180
	ctcaaaaatg	gctggcctac	ggccaggcaa	tctaccaggg	cgcggaacaag	ccgcgcgcgtc	9240
	gccactcgac	cgccggcgcc	cacatcaagg	caccctgcct	cgcgcggttc	ggatgatgacg	9300
10	gtgaaaacct	ctgacacatg	cagctcccg	agacggtcac	agcttgtctg	taagcggatg	9360
	ccgggagcag	acaagcccg	cagggcgcg	cagcgggtgt	tggcgggtgt	cggggcgcag	9420
	ccatgaccca	gtcacgtagc	gatagcggag	tgtatactgg	cttaactatg	cggcatcaga	9480
	gcagattgta	ctgagagtgc	accatatg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	9540
	aaaataccgc	atcaggcgct	cttcgccttc	ctcgcctact	gactcgctgc	gctcggctcgt	9600
15	tcggctgcgg	cgagcggat	cagctcactc	aaaggcggta	atacggttat	ccacagaatc	9660
	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	9720
	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	atcacaaaaa	9780
	tcgacgctca	agtcagaggt	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	aggcggttcc	9840
	ccctggaagc	tcctcgtgc	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	gatacctgtc	9900
20	cgcctttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	ggatatctcag	9960
	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagcccg	10020
	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	acgacttatt	10080
	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggatgtag	gcggtgctac	10140
	agagttcttg	aagtgggtgg	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	ttggtatctg	10200
25	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	ccggcaaaaa	10260
	aaccaccgct	ggtagcgggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	10320
	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacgggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	10380
	ctcacgtaa	gggatttttg	tcatgcatga	tatatctccc	aatttgtgta	gggcttatta	10440
	tgcacgctta	aaaataataa	aagcagactt	gacctgatag	tttggctgtg	agcaattatg	10500
30	tgcttagtgc	atctaacgct	tgagttaagc	cgcgccgcga	agcggcgctc	gcttgaacga	10560
	atttctagct	agacattatt	tgccgactac	cttgggtgatc	tcgcctttca	cgtagtggac	10620
	aaattcttcc	aactgatctg	cgcgcgaggc	caagcgatct	tcttcttgct	caagataagc	10680
	ctgtctagct	tcaagtatga	cgggctgata	ctgggcccgc	aggcgctcca	ttgcccagtc	10740
	ggcagcgaca	tccttcggcg	cgatttttgc	ggttactgcg	ctgtacccaaa	tgcgggacaa	10800
35	cgtaagcact	acatttcgct	catcgccagc	ccagtcgggc	ggcgagttcc	atagcgtaaa	10860
	ggtttcattt	agcgctcaa	atagatcctg	ttcaggaacc	ggatcaaaga	gttcctccgc	10920
	cgttgacct	accaaggcaa	cgtatgttc	tcttgctttt	gtcagcaaga	tagccagatc	10980
	aatgtcgatc	gtggctggct	cgaagatacc	tgcaagaatg	tcattgcgct	gccattctcc	11040
	aaattgcagt	tcgcgcttag	ctggataacg	ccacggaatg	atgtcgtcgt	gcacaacaat	11100
40	ggtgacttct	acagcgcgga	gaatctcgct	ctctccaggg	gaagccgaag	tttccaaaag	11160
	gtcgttgatc	aaagctcgcc	gcgttggttc	atcaagcctt	acggtcaccg	taaccagcaa	11220
	atcaatatca	ctgtgtggct	tcaggccgcc	atccactgcg	gagccgtaca	aatgtacggc	11280
	cagcaacgct	ggttcgagat	ggcgctcgat	gacgccaaact	acctctgata	gttgagtcga	11340
	tacttcggcg	atcacgcctt	cccccatgat	gtttaacttt	gttttagggc	gactgccttg	11400
45	ctgcgtaaca	tcgttgctgc	tccataacat	caaacatcga	cccacggcgt	aacgcgcttg	11460

ctgcttggat gcccaggga tagactgtac cccaaaaaa cagtcataac aagccatgaa 11520
aaccgccact gcg 11533

<210> 4

5 <211> 11533

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Expression vector UH201

<400> 4

15 ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60
ttattctaataa acgcgtctt ttctcttagg tttaaccgcc aatatatcct gtcaaact 120
gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaca gctatgacca 180
tgattacgcc aagcttgcac gccgatcccc cccactccgc cctacactcg tatatatatg 240
cctaaacctg ccccgcttct catatgtgat attattattt cattattagg tataagatag 300
taaacgataa ggaaagacaa ttatttgaga aagccatgct aaaatataga tagatatacc 360
ttagcagggtg tttattttac aacataacat aacatagtag ctagccagca ggcaggctaa 420
20 aacatagtat agtctatctg caggggggtac ggtcgactct agactagtgg atccgtcgaa 480
gctagcttgg gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 540
gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggc cagccattc gccgcaagc 600
tcttcagcaa tatcagggg agccaacgct atgtctgat agcggtcgc cacaccagc 660
cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 720
25 gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg 780
aacagtctcg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 840
ccggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttgggtg gtcgaatggg 900
caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 960
tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tctgccccg gcacttcgcc caatagcagc 1020
30 cagtccttc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgctcgtg 1080
gccagccacg atagccgcgc tgctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggctc 1140
gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcacagag 1200
cagccgattg tctgttgtgc ccagtcacag ccgaatagcc tctccacca agcggccgga 1260
gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc caagctccca tgggccctcg actagagtcg 1320
35 agatccgata tcgcccgggc tcgactctag aggatccaag cttcactgct taaattcaca 1380
aaaagagaaa agtaagacca aaggaataaa tcacctcaa accaaaaaca catcatacaa 1440
aatcatcaaa cataaatctc cagatgtatg agcaccaatc cagttatata acactcttaa 1500
caccaaatca acagatttaa cagcgaaata agcttaagcc catacaatta tccgatccaa 1560
acaaatataa tcgaaaccgg cagaggaata agcaagtga tcaaaaagta tgggacgagg 1620
40 aagaagatga tacctgaatg agaaagtcaa taacctgac ccgaatcgtt ttgaagaaaa 1680
tggagaaaat cggttgtatg gaataaaatc ttcgaatgat gagatatatg atctctttgg 1740
tgtcagtcac atggcacacg ctatcaattt agaaaaacgc ggtggttggc caccagaatt 1800
actacttctc ggtctgattt ggtcatatcc gtattaagtc cggttaatat ttccataaac 1860
tgggggttga acattcgggt tctttttttc agttagtcgc atttggagtt ttgagtatgg 1920
45 aaaaataata ctgaatttat ttgttcaaac tgttttggaa aaaatatttc ccttaattac 1980

	gaatataatt aaaatttttaa aattcatttt attagatctt ggttaattcg gtttaattgca	2040
	ttaatgaatt tcggtttaag tcggttttcg gtttttatgt cccaccacta tctacaaccg	2100
	atgatcaacc ttatctccgt attcaccaca aacagtcac actctcactt gacacaaaaa	2160
	ctcttttgtc tccgtctctc tgtctctcgg atccccgggt aggtcagtc cttatgttac	2220
5	gtcctgtaga aaccccaacc cgtgaaatca aaaaactcga cggcctgtgg gcattcagtc	2280
	tggatcgca aaactgtgga attggtcagc gttgggtgga aagcgcgtta caagaaagcc	2340
	gggcaattgc tgtgccagga gtttttaacg atcaagttcg ccgatgccag atattcgtaa	2400
	ttatgccggc aacgtcttgg tatcagcgcc gaagtcttta ttccgaaagg ttgggcaggc	2460
	cagcgtatcg tgctgcgttt cgatgcggtc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat	2520
10	caggaagtga tggagcatca gggcggctat acgccatttg aagccgatgt cacgccgat	2580
	gttattgccg ggaaaagtgt acgtaagttt ctgcttctac ctttgatata tatataataa	2640
	ttatcattaa ttagtagtaa tataatattt caaatatttt tttcaaaaata aaagaatgta	2700
	gtatatagca attgcttttc tgtagtttat aagtgtgtat attttaattt ataacttttc	2760
	taatatatga ccaaaatttg ttgatgtgca ggtatcaccg tttgtgtgaa caacgaactg	2820
15	aactggcaga ctatcccgcc gggaaatggtg attaccgacg aaaacggcaa gaaaaagcag	2880
	tcttacttcc atgatttctt taactatgcc ggaatccatc gcagcgtaat gctctacacc	2940
	acgccgaaca cctgggtgga cgatatcacc gtgggtgacg atgtcgcgca agactgtaac	3000
	cacgcgtctg ttgactggca ggtgggtggc aatgggtgat tcagcgttga actgcgtgat	3060
	gcggtatcaac aggtgggttc aactggacaa ggcactagcg ggactttgca agtgggtgaat	3120
20	ccgcacctct ggcaaccggg tgaaggttat ctctatgaac tgtgcgtcac agccaaaagc	3180
	cagacagagt gtgatatcta cccgcttcgc gtcggcatcc ggtcagtggc agtgaagggc	3240
	gaacagttcc tgattaacca caaacgttc tactttactg gctttggtcg tcatgaagat	3300
	gcggacttac gtggcaaagg attcgataac gtgctgatgg tgcacgacca cgcattaatg	3360
	gactggattg gggccaactc ctaccgtacc tcgcattacc cttacgctga agagatgctc	3420
25	gactgggcag atgaacatgg catcgtgggtg attgatgaaa ctgctgctgt cggctttaac	3480
	ctctctttag gcattggttt cgaagcgggc aacaagccga aagaactgta cagcgaagag	3540
	gcagtcaacg gggaaactca gcaagcgcac ttacaggcga ttaaagagct gatagcgcgt	3600
	gacaaaaacc acccaagcgt ggtgatgtgg agtattgcc acaaacggga taccgctccg	3660
	caagtgcacg ggaatatatt gccactggcg gaagcaacgc gtaaactcga cccgacgcgt	3720
30	ccgatcacct gcgtcaatgt aatgttctgc gacgtcaca ccgataccat cagcgatctc	3780
	tttgatgtgc tgtgcctgaa ccgttattac ggatgggtatg tccaaagcgg cgatttgga	3840
	acggcagaga aggtactgga aaaagaactt ctggcctggc aggagaaact gcatcagccg	3900
	attatcatca ccgaatacgg cgtggatacg ttagccgggc tgcactcaat gtacaccgac	3960
	atgtggagtg aagagtatca gtgtgcatgg ctggatatgt atcaccgcgt ctttgatcgc	4020
35	gtcagcgccg tcgtcgggtga acaggtatgg aatttcgccg attttgcgac ctcgcaaggc	4080
	atattgccg tggcggttaa caagaaaggg atcttcactc gcgaccgcaa accgaagtgc	4140
	gcggcttttc tgctgcaaaa acgctggact ggcattgaact tcggtgaaaa accgcagcag	4200
	ggaggcaaac aatgaatcaa caactctcct ggcgccaccat cgtcggctac agcctcggga	4260
	attgctaccg agctcggtag ccggcgcaaa aatcaccagt ctctctctac aaatctatct	4320
40	ctctctatct ttctccagaa taatgtgtga gtagtccca gataaggga ttagggttct	4380
	tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat aagaaaccct tagtatgtat ttgtatttgt	4440
	aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt cctaaaacca aaatccagt accgggtacc	4500
	gagctcgaat tcaactggcg tcgttttaca acgactcagc agcttgacag gaggcccgat	4560
	ctagtaacat agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gtttgccgcg tatattttgt	4620
45	tttctatcgc gtattaaatg tataattgcg ggactctaata cataaaaaacc catctcataa	4680

	ataacgtcat gcattacatg ttaattatta catgcttaac gtaattcaac agaaattata	4740
	tgataatcat cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt	4800
	ttgaacgatc ggggatcatc cgggtctgtg gcgggaactc cacgaaaata tccgaacgca	4860
	gcaagatcgg tcgatcgact cagatctggg taactggcct aactggcctt ggaggagctg	4920
5	gcaactcaaa atccctttgc caaaaaccaa catcatgcca tccaccatgc ttgtatccag	4980
	ccgcgcgcaa tgtaccccg cgtgtgtatc ccaaagcctc atgcaaccta acagatggat	5040
	cgtttgaag gcctataaca gcaaccacag acttaaaacc ttgcgcctcc atagacttaa	5100
	gcaaatgtgt gtacaatgta gatcctaggc ccaacctttg atgcctatgt gacacgtaaa	5160
	cagtactctc aactgtccaa tcgtaagcgt tcctagcctt ccaggggcca gcgtaagcaa	5220
10	taccagccac aacaccctca acctcagcaa ccaaccaagg gtatctatct tgcaacctct	5280
	ctagggtcatc aatccactct tgtgggtgtt gtggctctgt cctaaagttc actgtagacg	5340
	tctcaatgta atgggttaacg atgtcacaaa ccgcggccat atcggtctgt gtagctggcc	5400
	taatctcaac tgggtctctc tccggagaca tgtcgagatt atttggattg agagtgaata	5460
	tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaacgt cagtggagca tttttgacaa	5520
15	gaaatatttg ctactgata gtgacctag gcgacttttg aacgcgcaat aatggtttct	5580
	gacgtatgtg cttagctcat taaactccag aaaccgcgg ctgagtggct ccttcaacgt	5640
	tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtccc cgctatcggc gggggtcata	5700
	acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg tttccgcct tcagtttaa	5760
	ctatcagtgt ttgacaggat cctgcttgg aataattgtc attagattgt ttttatgcat	5820
20	agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa cggatgttaa ttcagtacat	5880
	taaagacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgttta caccacaata	5940
	tatcctgcc aacagcagcc aacagctccc cgaccggcag ctccggcaca aatcaccacg	6000
	cgttaccacc acgcccggcc gccgcatggt gttgaccgtg ttcgcccggc ttgccgagtt	6060
	cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcggggcg gaggccgcca agggcccagg	6120
25	cgtgaagttt ggcccccgcc ctaccctcac cccggcacag atcgcgcacg cccgcgagct	6180
	gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggctgca ctgcttggcg tgcacgctc	6240
	gaccctgtac cgcgcaactg agcgcagcga ggaagtgcg cccaccgagg ccaggcggcg	6300
	cgggtgcctc cgtgaggacg cattgaccga ggcgcagcgc ctggcggccg ccgagaatga	6360
	acgccaaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc aggacgaacc gtttttcatt	6420
30	accgaagaga tcgaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg tggttcgagcc gccgcgcac	6480
	gtctcaaccg tgccggtgca tgaatacctg gccgggttgt ctgatgccaa gctggcggcc	6540
	tgcccgccca gcttggccgc tgaagaaacc gagcggccgc gtctaaaaag gtgatgtgta	6600
	tttgagtaaa acagcttgcg tcatgcggtc gctgcgtata tgatgcgatg agtaaataaa	6660
	caaatacgca aggggaacgc atgaaggtta tcgctgtact taaccagaaa ggcgggtcag	6720
35	gcaagacgac catcgcaacc catctagccc gcgccctgca actcgcggg gccgatgttc	6780
	tggttagtga ttccgatccc cagggcagtg cccgcgattg ggcggccgtg cgggaagatc	6840
	aaccgctaac cgttgtcggc atcgaccgcc cgacgattga ccgcgacgtg aaggccatcg	6900
	gccggcgca cttcgtagt atcgacggag cgcccaggc ggcggacttg gctgtgtccg	6960
	cgatcaaggc agccgacttc gtgctgattc cggtcagacc aagcccttac gacatatggg	7020
40	ccaccgccga cctggtggag ctggttaagc agcgcattga ggtcacggat ggaaggctac	7080
	aagcggcctt tgcgtgtcg cgggcgatca aaggcacgcg catcggcggt gaggttgccg	7140
	aggcgtggc cgggtacgag ctgcccattc ttgagtcccg tatcacgcag cgctgagct	7200
	accaggcac tgccgcgcgc ggcacaaccg ttcttgaatc agaaccgcag ggcgacgtg	7260
	cccgcgaggt ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaaa actcatttga gttaatgagg	7320
45	taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcc ggccgtccga gcgcacgcag	7380

	cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgccca gccatgaagc ggggtcaactt	7440
	tcagttgccg gcgaggatc acaccaagct gaagatgtac gcggtacgcc aaggcaagac	7500
	cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca gagtaaata gcaaatgaat	7560
	aaatgagtag atgaatttta gcggtctaaag gaggcgcat ggaaaatcaa gaacaaccag	7620
5	gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg cgggtggcca ggcgtaagcg	7680
	gctgggttgt ctgccggccc tgcaatggca ctggaacccc caagcccag gaatcggcgt	7740
	gagcggtcgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg gcgctgggtg atgacctgg	7800
	ggagaagttg aaggccgcgc aggcgcgcca gcggcaacgc atcgaggcag aagcacgccc	7860
	cggatgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa gaatcccggc aaccgcggc	7920
10	agccgggtgc ccgtcgatta ggaagccgcc caaggcgac gagcaaccag attttttcgt	7980
	tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgcga tagtcgcagc atcatggacg tggccgtttt	8040
	ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc cgctacgagc ttccagacgg	8100
	gcacgtagag gtttccgcag ggccggccgg catggccagt gtgtgggatt acgacctgg	8160
	actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga taccgggaag ggaagggaga	8220
15	caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta ctcaagttct gccggcgagc	8280
	cgatggcgga aagcagaaag acgacctggg agaaacctgc attcggttaa acaccacgca	8340
	cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggccgc ctggtgacgg tatccgaggg	8400
	tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa accgggccc cggagtacat	8460
	cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca gaaggcaaga acccgacgt	8520
20	gctgacgggt caccgccatt actttttgat cgatcccggc atcgccggtt ttctctaccg	8580
	cctggcacgc cgcgccgcag gcaaggcaga agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga	8640
	acgcagtggc agcgcgggag agttcaagaa gttctgtttc accgtgcgca agctgatcgg	8700
	gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg gggcaggctg gcccgatcct	8760
	agtcattgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc gccggttcct aatgtacgga	8820
25	gcagatgcta gggcaaatg ccctagcagg ggaaaagggt cgaaaagggt tctttcctgt	8880
	ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg aaccggaacc cgtacattgg	8940
	gaacccaaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa	9000
	aaaaggcgat ttttcgcct aaaactcttt aaaacttatt aaaactctta aaaccgcct	9060
	ggcctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag ctgcaaaaag cgcctaccct	9120
30	tcggctcgtg cgctccctac gcccgcgcgc ttccgctcgg cctatcgcg cgcgtggccg	9180
	ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg cgcggaacg ccgcgccgtc	9240
	gccactcgac cgccggcgcc cacatcaagg caccctgcct cgcgcgtttc ggtgatgacg	9300
	gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacgggtcac agcttgtctg taagcggatg	9360
	ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggcgag	9420
35	ccatgacca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg cttaactatg cggcatcaga	9480
	gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag	9540
	aaaataccgc atcaggcgct ctccgcctc ctgcctcact gactcgctgc gctcggtcgt	9600
	tcggctcggg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc	9660
	aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa	9720
40	aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa	9780
	tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc	9840
	ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc	9900
	cgctttctc ctttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag	9960
	ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagccga	10020
45	ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagc acgacttacc	10080

gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 10140
agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 10200
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaca 10260
aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 10320
5 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 10380
ctcacgttaa gggatttttg tcatgcatga tatatctccc aatttggtgta gggcttatta 10440
tgcacgctta aaaataataa aagcagactt gacctgatag tttggctgtg agcaattatg 10500
tgcttagtgc atctaacgct tgagttaagc cgcgcgcgca agcggcgctcg gcttgaacga 10560
atctctagct agacattatt tgccgactac cttgggtgac tcgcctttca cgtagtggac 10620
10 aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggg caagcgatct tcttcttgct caagataagc 10680
ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggccggc aggcgctcca ttgcccagtc 10740
ggcagcgaca tccttcggcg cgattttgccc gggtactgcg ctgtaccaa tgcgggacaa 10800
cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcgggc ggcgagttcc atagcgtaa 10860
ggtttcattt agcgccctca atagatcctg ttcaggaacc ggatcaaaga gttcctccgc 10920
15 cgctggacct accaaggcaa cgctatgttc tcttgctttt gtcagcaaga tagccagatc 10980
aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgct gccattctcc 11040
aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg atgtcgctgt gcacaacaat 11100
ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgct ctctccaggg gaagccgaag tttccaaaag 11160
gtcgttgatc aaagctcgcc gcgttgtttc atcaagcctt acggtcaccg taaccagcaa 11220
20 atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcg gagccgtaca aatgtacggc 11280
cagcaacgct ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaact acctctgata gttgagtcga 11340
tacttcggcg atcacgctt ccccatgat gtttaacttt gttttagggc gactgccttg 11400
ctgcgtaaca tcgttgctgc tccataacat caaacatcga cccacggcgt aacgcgcttg 11460
ctgcttggat gcccgaggca tagactgtac cccaaaaaaa cagtcataac aagccatgaa 11520
25 aaccgccact gcg 11533

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

30 <213> Artificial Sequence

<220>

35

<223> Oligonucleotide primer

<400> 5

acggatccga gagacagaga gacggagaca aaa

<210> 6

40

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Oligonucleotide primer

<400> 6

gcggatccaa gcttcactgc ttaaattc

28

10

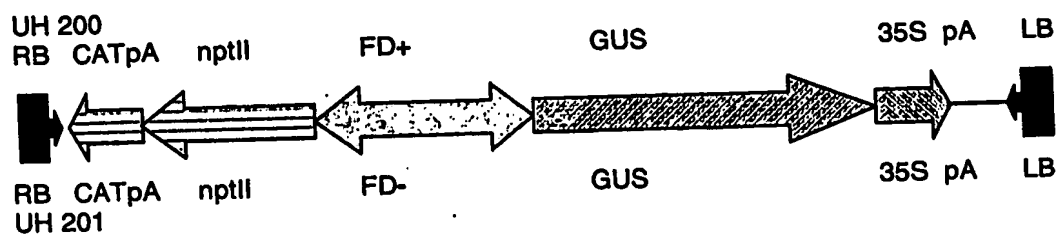


Fig. 1

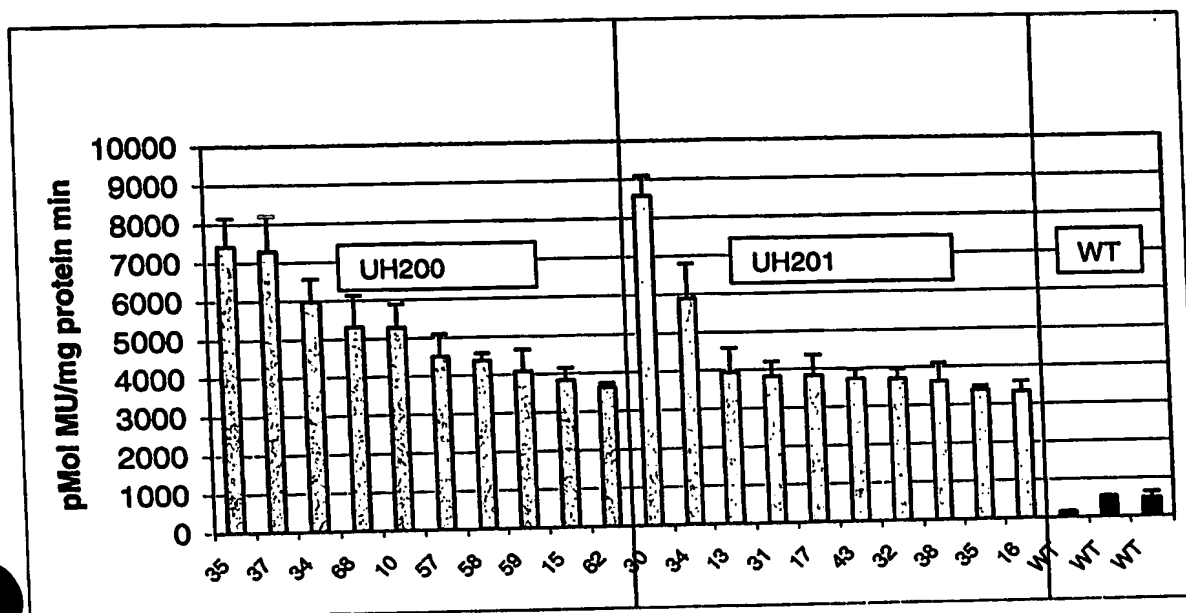


Fig. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.